



*Sveriges lantbruksuniversitet*

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

# Årstidsvariationen i leverstatus hos nötkreatur som konsumerar Östersjövatten

Sandra Eklund

*Uppsala*

*2012*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2012:55*



# Årstidsvariationen i leverstatus hos nötkreatur som konsumerar Östersjövatten

Sandra Eklund

*Handledare: Kjell Malmlöf, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

*Examinator: Eva Hellmén, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2012  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

*Kurskod: EX0329, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: nötkreatur, cyanotoxiner, cyanobakterier, leverstatus, leverenzym, microcystin, nodularin, Östersjön*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>  
ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2012:55*



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>SAMMANFATTNING .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>2</b>
<b>INLEDNING .....</b>	<b>3</b>
Bakgrund.....	3
Syfte och hypotes.....	4
<b>LITTERATURÖVERSIKT .....</b>	<b>4</b>
Cyanobakterier.....	4
Cyanotoxiner.....	6
Mikrocystiner och nodulariner.....	8
Patologi och fallrapporter.....	11
Hälsorisker kopplade till toxiska cyanobakterier.....	17
Förhindra problem orsakade av toxiska cyanobakterier .....	19
Faktorer som påverkar toxinproduktionen.....	20
<b>MATERIAL OCH METODER.....</b>	<b>22</b>
Studiedesign och analyser.....	22
<b>RESULTAT .....</b>	<b>24</b>
Algblomningar under sommaren 2011 .....	24
Vattenanalysresultat.....	27
Serumanalysresultat .....	29
Säsongspåverkade variabler.....	29
Säsongspåverkade variabler.....	32
<b>DISKUSSION.....</b>	<b>37</b>
Säsongspåverkade variabler.....	37
Säsongspåverkade variabler.....	40
<b>SAMMANFATTANDE SLUTSATSER .....</b>	<b>37</b>
<b>LITTERATURFÖRTECKNING .....</b>	<b>41</b>

## SAMMANFATTNING

En betydande del av den svenska nötkreaturspopulationen finns i kustnära områden. Enligt gammal hävd och av praktiska skäl tillåts boskap på perifert belägna marker släcka törsten i de vattendrag som finns att tillgå på betet och längs Östersjökusten dricker djuren havsvatten då färskvatten ofta är en bristvara. Algblomningar med toxinbildande cyanobakterier uppträder varje sommar i Östersjön liksom i många åar och insjöar. Temperatur, solinstrålning och väderförhållanden styr omfattningen av blomningarna. Egentliga Östersjön, inräknat Finska viken, Ålands hav och Skärgårdshavet tillhör de mest utsatta områdena när det gäller massförekomst av cyanobakterier. På grund av klimatförändringar, utfiskning och utsläpp av närsalter blir toxiska algblomningar allt vanligare och allt mer extensiva. Av denna anledning är det viktigt att undersöka hur kustbetande kreaturs hälsostatus påverkas under betessäsongen. Speciellt intressant i detta sammanhang är undersökning av leverstatus eftersom algtoxiner ofta angriper levern.

En fältstudie, som sträcker sig över betessäsongen i sin helhet och som baserar sig på blodprover och vattenprover, genomfördes under maj – oktober 2011, och indelades i 3 perioder: period 1 (15/5- 30/6), period 2 (1/7-31/7) och period 3 (1/8-15/10). Besättningar med lämpligt djurmaterial och kontinuerlig betesdrift där havsvatten utgjorde huvudsaklig dricksvattenkälla valdes ut. Totalt ingick 4 besättningar, en på svenska ostkusten och 3 på Åland. I varje besättning utsågs 6 djur att ingå i försöket. I besättningen på Hasselö var alla kor, men i de övriga besättningarna utgjordes försöksdjuren enbart av kvigor. Vattenprover insamlades och frystes in fortlöpande under betessäsongen vid respektive kustbete för att analyseras under hösten 2011, efter att fältförsöket avslutats. Blodproverna centrifugerades och frystes in efter provtagning i fält och alla prover analyserades sedan samtidigt vid Klinisk Kemiska Laboratoriet, SLU, Uppsala. Vattenproverna analyserades vid institutionen för Anatomi, Fysiologi och Biokemi, SLU, Uppsala och algblomningen följdes kontinuerligt via SMHIs hemsida.

Signifikant höjning av serumnivåer av parametrarna alanintransferas (ALAT) i period 3, gallsyror i period 2 och 3 samt triglycerider i period 2, utgör de mest intressanta fynden. Förändringarna är dock små, vilket kan förklaras med att kustnära cyanobakterieblomning förekom i mycket liten skala särskilt i de aktuella kustregionerna under sommaren 2011. Det kan dock inte uteslutas att de påvisade förändringarna i serumhalter av nämnda variabler i viss mån skulle kunna avspegla en lindrig – måttlig belastning på levern, som delvis skulle kunna härledas till konsumtion av dricksvatten innehållande cyanotoxiner. Förvånande nog är de relativt höga koncentrationer av cyanotoxiner som återfanns i ett flertal vattenprover, trots att ingen visuellt påvisbar cyanobakterieblomning förekom i vattnet då proverna insamlades. I ett vattenprov insamlat under period 3 i Ängösund (besättning 2), tangeras gränsen för vad WHO rekommenderar som tillrådligt för humankonsumtion. Huvudkonklusionen av denna studie är att kor på strandnära bete under år med svag algblomning visar ringa eller som mest måttlig påverkan på variabler, som skulle kunna indikera leverskada orsakad av exponering för cyanotoxiner. Så tillvida innehåller denna studie ett unikt referensmaterial för framtida fältstudier under kraftig algblomning.

## SUMMARY

A fairly large percentage of the Swedish population of livestock is found in coastal areas. According to old traditions and for practical reasons, cattle grazing on remote pastures only have access to naturally occurring surface waters and in coastal grazing grounds sea water is the sole water source available. Algal blooms consisting of toxic cyanobacteria are reoccurring phenomena in the Baltic Sea as well as in many lakes and rivers. The extent of the blooms is dependent on temperatures, solar radiation and weather conditions. The areas, mostly affected by ample algal blooms are the Archipelago Sea, the Åland Sea, the Gulf of Finland, the Northern Baltic Proper, the Western and the Eastern Gotland Basin, the Gulf of Riga, the Gdansk Basin and the Bornholm Basin. Climate change, fish depletion, pollution and emission of nutrients into the environment cause heavier algal blooms to appear more frequently. A field study based on blood and water samples was conducted during May – October 2011, thereby covering the entire grazing season. The study was divided in three periods: period 1 (15/5- 30/6), period 2 (1/7-31/7) and period 3 (1/8-15/10). Farms with representable animals and continuous grazing during summer with brackish water as the main source of drinking water were selected. A total of 4 units participated in the study. One farm was located on the Swedish east coast and the rest were located on the Åland Islands. In each herd, 6 animals were chosen to participate in the study. Most of them were heifers but the herd on Hasselö consisted of cows.

Water samples were collected and frozen continuously during the grazing season. They were analyzed during the autumn 2011 after the completion of the field experiments. Blood samples were allowed to clot before being centrifuged and frozen (-20° C), shortly after sampling. All serum samples were analyzed simultaneously at Klinisk Kemiska Laboratoriet, Swedish University of Agriculture (SLU), Uppsala, Sweden. The water samples were all analyzed at The Department of Anatomy, Physiology and Biochemistry, SLU, Uppsala, Sweden. Significant rise in serum concentrations of alanintransferas in period 2, bile acids in period 2 and 3 as well as triglycerides in period 3, were the most intriguing findings. The changes in serum levels were however small, which might be explained by the fact that cyanobacterial blooms were very scarce in coastal areas during the summer of 2011. However, it cannot be excluded that the detected changes in serum variables mentioned above, reflect a mild – moderate stress on the liver, which in part may be explained by cyanotoxins in the drinking water. The most striking and unexpected finding is the relatively high concentrations of cyanotoxins found in several water samples, despite no visual cyanobacterial bloom present at the time of sampling and also despite the fact that these observations were made in period 3. In one of the water samples the cyanotoxin concentration is very close to the safety limit value for drinking water intended for human consumption, as recommended by the World Health Organization (WHO). In conclusion this study has shown that during years of scarce algal blooms, effects on serum variables indicative of liver damage following exposure to cyanotoxins of cows on costal pastures, are very modest. Inasmuch, this study provides a unique reference material for future field studies during periods of heavy algal blooms.

## INLEDNING

### Bakgrund

Sveriges mångskiftande kust är 700 mil lång (Lennartsson och Stighäll, 2005). En stor del av den svenska nötkreaturspopulationen finns i kustnära områden. Under betessäsongen låter många djurhållare, av tradition och praktiska skäl, boskap på perifert belägna marker täcka sitt vattenbehov från vattendrag och sjöar och längs östersjökusten används också havsvatten eftersom färskvattentillgången är begränsad eller obefintlig. Algblomningar med toxinbildande cyanobakterier förekommer ofta under sommarperioden i Östersjön liksom i åar och insjöar. Omfattningen varierar beroende på temperatur, solinstrålning och vindförhållanden. Egentliga Östersjön, inräknat Finska viken, Ålands hav och Skärgårdshavet är de delar som är mest utsatta för omfattande algblomningar.

Det sammanlagda antalet nötkreatur i de mest utsatta kustkommunerna räknat från Vellinge i södra Skåne till Älvkarleby i norra Uppland, uppgår till ca 225 000 djur (SCB, 2007). Det motsvarar 14,8 % av den totala svenska nötkreaturspopulationen. Ett i framtiden allt varmare och mer nederbördsrikt klimat tros kunna leda till kraftigare algblomningar, vilket potentiellt kan medföra allvarliga konsekvenser för våra kustbetande nötkreatur, eftersom en stor del av de cyanobakteriearter som förekommer i Östersjön, är toxinproducenter (Kononen et al., 1998; de Figueiredo et al., 2004; Sivonen, 2009). Det är således stor risk att djuren i en ökande omfattning exponeras för algtoxiner då de dricker havsvatten. Effekterna av detta är i mångt och mycket outforskade och behöver kartläggas.

*Microcystis* och *Nodularia* hör till de vanligaste toxinbildande cyanobakterierna i Östersjön (Kononen et al., 1998; Sivonen, 2009). De substanser, som dessa cyanobakterier bildar, är levertoxiska och hämmar intracellulära fosfatasenzymer, vilket åstadkommer en hyperfosforylering av proteiner inne i hepatocyterna. Detta kan leda till livshotande invärtes blödningar (McGavin & Zachary, 2007). Utomlands har det förekommit att nötkreatur insjuknat och dött efter att ha druckit vatten innehållande cyanotoxiner; oftast microcystiner (Puschner et al., 1998; Frazier et al., 1998). I dessa fall rör det sig dock om sötvattentäkter med goda näringsmässiga förutsättningar där algerna ofta vuxit explosionsartat vid gynnsamma väderförhållanden. Det finns inga säkra rapporter från Sverige om betande djur som insjuknat eller avlidit på bete till följd av cyanotoxinförgiftning. Dock förekommer det oförklarliga dödsfall bland betesdjur, vilka sällan blir utredda eftersom det är för omständigt och kostsamt att skicka prover för analys eller kroppar till obduktion. Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) efterlyser remittering av misstänkta fall och påpekar samtidigt att mer forskning behövs (SVA<sup>1</sup>, 2011; SVA<sup>2</sup>, 2011). Kunskapen är alltså mycket begränsad och tydliga rekommendationer för vattenresurser på kustbeten saknas.

Det stora flertalet förgiftningsfall äger rum under sommarhalvåret, ofta i samband med extra varmt och soligt väder, men det förekommer också förgiftningsfall under andra tider på året. I delstaten Georgia i USA drabbades år 1998 ett antal nötkreatur av akut cyanotoxikos så sent som i november och dessutom under en för årstiden ovanligt kall period (Frazier et al., 1998). I en hjord på 50 djur insjuknade 4 stycken, varav 3 dog. Blodanalyser visade att djuren hade förhöjda nivåer av ASAT, bilirubin och kreatinfosfokinas.



Även om akuta förgiftningsfall har inträffat utomlands, är det fortfarande mycket som är oklart vad gäller subkliniska effekter av djurens intag av alggifter och eventuella påföljande hälsorisker på längre sikt. En frågeställning är huruvida livsmedelskvaliteten på något sätt kan äventyras av att livsmedelsproducerande djur dricker algtoxininnehållande vatten. Det finns bl.a. australiensiska studier gjorda på nötkreatur, som efter 28 dagars exponering av låga – måttliga doser av microcystin, inte uppvisat några kliniska symtom (Orr et al., 2003). Man kunde i dessa studier inte påvisa bioackumulering av toxinet i lever eller blodplasma. Man har inte heller kunnat påvisa microcystiner i mjölk efter att ha utsatt lakterande kor för måttliga nivåer av microcystiner under 3-4 veckor (Orr et al., 2001; Feitz et al., 2002). Frågan är dock vad som händer om djuren utsätts för måttliga – höga halter av cyanotoxiner under stora delar av betessäsongen. Syftet med studien var bland annat att försöka besvara denna frågeställning.

Det är av yttersta vikt att man även i Östersjökustregionen kan garantera god djurhälsa, säkra livsmedel och hållbar produktion, samtidigt som man kan fortsätta bevara skärgårdens strandbeten. Det unika öppna landskapet, som hålls i hävd av betande kreatur, är en ovärderlig och väsentlig del av vårt nordiska natur- och kulturarv och utgör en del av det nationella miljömålet (Naturvårdsverket, miljömålsportalen, 2012).

## Syfte och hypotes

Mot ovan givna bakgrund och det faktum att inga fältstudier, som sträcker sig över hela betesperioden hittills har kunnat spåras i litteraturen, genomfördes denna studie. Syftet var att undersöka förekomsten av subkliniska effekter hos nötkreatur till följd av exponering för algtoxiner i dricksvatten. Av denna anledning samlades vattenprover in under vår, sommar och höst 2011 och har analyserats med avseende på fosfatshämmande aktivitet. Studien baseras på hypotesen att subkliniska effekter av algtoxin på leverfunktion kan spåras med hjälp av serumanalyser av specifika leverenzymmer och andra relevanta variabler, vars nivåer kan förväntas stiga till följd av skadlig leverpåverkan. Samt att denna påverkan skulle vara störst i mitten av sommaren, studiens period 2. Period 1 och 3 skulle tjäna som kontrollperioder.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Cyanobakterier

Cyanobakterier, även kallade blågrönalger, är autotrofa prokaryota mikroorganismer med en mycket lång evolutionär historia (Sivonen, 2009). Man anser numera att blågröna alger är närmare besläktade med bakterier och de räknas inte längre till växtriket utan tillhör nu riket Monera och divisionen Cyanophyta (McGavin et al., 2007). De har förmåga att bilda syre genom fotosyntes på samma sätt som växter och de har därmed i stor utsträckning bidragit till uppkomsten vår syrerika atmosfär (Sivonen, 2009). Vissa arter kan även fixera kväve. Många cyanobakterier producerar dessutom giftiga substanser; cyanotoxiner. Cyanotoxiner orsakar cellskador genom att inhibera intracellulära fosfataser, vilket resulterar i hyperfosforering av cytoskeletala proteiner (McDermott et al., 1998).

De destruktiva processer som initieras av cyanotoxinerna leder slutligen till celldöd eller till cellproliferation och cancer (Toivola et al., 1999; Boe et al., 1991; Fujiki et al., 1993).

Cyanobakterier förekommer i en mängd olika biotoper såsom sötvatten, brackvatten, saltvatten och varma källor; men även i jord och de återfinns i allt från ökenlandskap till glaciärer (Sivonen, 2009). Många cyanobakterier lever i ett mutualistiskt förhållande med andra organismer; exempelvis växter, lavar eller primitiva djur (Sivonen, 2009; Raven et al., 1999). I akvatiska ekosystem är cyanobakterierna, tillsammans med övriga fytoplankton, viktiga primärproducenter i näringskedjan.

I eutrofa (övergödda) vatten uppstår ofta massförekomst av cyanobakterier; så kallade algbloomingar, vilket kan medföra att stora mängder cyanotoxiner frigörs i vattnet med påföljande direkta och indirekta hälsorisker för människor och djur. I Östersjön utgör dominerande arter av cyanobakterier, såsom *Microcystis* spp., *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp. eller *Nodularia* spp., vanligen mer än 30% av algbiomassan under sommaren (Kononen et al., 1998; Sivonen, 2009). Mängden cyanobakterier har ökat under senare år och även andelen toxiska arter har ökat (Karjalainen et al., 2007).

Massförekomst av cyanobakterier manifesterar sig ofta som grönaktigt eller ibland rödaktigt skum som flyter på vattenytan. Gasvakuoler i cyanobakterierna och mukussekretion bidrar till uppkomsten av dessa ytansamlingar, som består av döende blågröna alger (Frazier et al., 1998). Sekundär bakterietillväxt i det flytande algtäcket kan bidra till ökad toxinproduktion (McGavin et al., 2007). Det finns dock även arter som trivs i djupare vatten och som inte ger upphov till de typiska ytvattenblomningarna; exempelvis *Cylindrospermopsis* och *Planktothrix* (Sivonen, 2009). En del benthiska (bottenlevande) cyanobakteriearter bildar biofilmer och algmattor. Man har funnit mattbildande microcystin- och nodularinproducenter i Antarktis. Microcystinproducerande mattbildande *Oscillatoria limosa* och *Phormidium konstantinosum*, som lever på alpina betesmarker i Schweiz har orsakat förgiftningsfall hos nötkreatur (Mez et al., 1997).

Innan man upptäckte cyanotoxinerna sågs blomningarna enbart som ett estetiskt problem då ytvattenansamlingarna satte käppar i hjulet för rekreation och fiske. Då det gröna skummet samlas längs stränder och förruttnar sprider det en motbjudande lukt. De starkt illaluktande metaboliter som cyanobakterierna producerar kan ge vattnet en obehaglig bismak av dy och även fisk, som fångas i sådana miljöer, kan ha denna otrevliga smaknyans.

Den första vetenskapliga rapporten som beskriver cyanotoxinförgiftning hos djur publicerades för drygt 130 år sedan (Francis, 1878; Codd et al., 1994). En djupdykning i litteraturen visar att alltsedan dess har hundratals fall av algtoxinförgiftning, både hos vilda och hos tama djur, förekommit runt hela världen (se Tabell 1). Förgiftningsfall hos djur har lett till ett ökat forskningsintresse för cyanobakterier och har även medfört ett tilltagande medialt intresse i takt med att allmänheten fått mer insikt i problematiken.

Systematisk övervakning av förekomsten av cyanobakterier sker på många håll i världen och har visat att utbredningen av giftiga cyanobakteriearter är större än man kunnat utläsa enbart utifrån inrapporterade förgiftningsfall.

Genom denna screening har man också kunnat fastställa att hepatotoxinproducerande arter är vanligare än neurotoxinproducerande cyanobakterier. Hepatotoxiska arter har man funnit i princip överallt där man har letat, medan neurotoxiska arter är vanligast i Nordamerika, Europa, Australien samt i Kina (Sivonen, 2009).

## Cyanotoxiner

Det finns stor variation bland cyanotoxiner när det gäller kemisk struktur och toxicitet (Dow & Sowboda, 2000; Kaebernick & Neilan, 2001; Briand et al., 2003). De klassificeras vanligen efter vilken typ av effekter gifterna har på levande organismer och indelas i dermatotoxiner (lipopolysackarider, lyngbyatoxin-a och aplysiatoxiner), neurotoxiner (anatoxin-a, homoanatoxin-a, anatoxin-a(s) och saxitoxiner) och hepatotoxiner (microcystiner, nodularin och cylindrospermopsin). Vissa av dessa toxiner är mycket potenta och kan leda till döden inom bara några minuter (neurotoxiner) eller timmar (hepatotoxiner) efter intag av höga doser (Sivonen, 2009). McDermott et al (1998) visar i en studie att däggdjursceller som exponeras för microcystiner genomgår morfologiska och biokemiska förändringar som slutligen leder till apoptos. Leverceller är den mest känsliga celltypen och redan 30 minuter efter exponeringen observerades vakuolbildning i cytoplasman, krympande celler, omfördelning av cellorganeller och kromatinkondensering hos hepatocyterna. Andra undersökta celltyper; fibroblaster, epitelceller och promyelocyter uppvisade samma förändringar, men först efter en längre tid.

Cyanotoxiner tar sig till levern på samma sätt som gallsalter d.v.s. genom att utnyttja det enterohepatiska kretsloppet. Efter att toxinerna intagits via vatten eller föda tas de snabbt upp av gallsyraproteiner och transporteras till levern (McDermott et al., 1998; Eriksson et al., 1990). Cyanotoxinernas huvudsakliga intracellulära påverkan är att de inhiberar aktiviteten hos serin/threonin-specifikt proteinfosfatas 1 och 2A (Runnegar et al., 1993; Toivola et al., 1994). Fosfataser är enzymer som är oumbärliga för den intracellulära signaltransduktionen (Sivonen, 2009). De sköter defosforlytering av olika molekyler i samverkan med kinaser som står för fosforlyeringen och genom den ständiga omsättningen av fosfatgrupper styrs otaliga cellfunktioner. Inhibering av fosfataser åstadkommer en hyperfosforlytering av proteiner inne i hepatocyterna, vilket kan resultera i cellproliferation och utveckling av cancer eller celldöd genom apoptos. Cellens energialstrande kraftverk mitokondrierna spelar en viktig roll i apoptosprocessen (Susin et al., 1998; Lemasters et al., 1998; Migita et al., 2003; Ding & Ong, 2003). Microcystin-LR har visat sig kunna framkalla morfologiska och biokemiska förändringar i mitokondrier, vilka sedermera leder till apoptos (Ding et al., 2001, 2002; Petrosillo et al., 2003).

Microcystin-LR inducerar bildning av ROS (reactive oxygen species), vilket orsakar en ökad membranpermeabilitet hos mitokondrierna genom att membranbundna transportkanaler öppnas (Ding et al., 2002). Cytokrom c, som spelar en nyckelroll i den intramitokondriella elektrontransportkedjan, kan därmed passera genom transportkanaler ut i cytosolen (Ding et al., 2001, 2002). Relokalisering av cytokrom c är en viktig signal för initiering av apoptosprocessen (Manon et al., 2001; Cai et al., 1998).

Flertalet av de toxinproducerande arterna tillhör de planktoniska cyanobakterierna som återfinns i söt- och brackvatten (Sivonen, 2009). Det förekommer emellertid en del giftiga benthiska arter i flodvattensmiljöer och i undantagsfall även i landbaserade ekosystem. Toxiner som bildas av benthiska cyanobakterier tenderar att skilja sig från planktiska cyanotoxiner bland annat genom att de ofta är cytotoxiska.

Det finns många oklarheter kring orsaken till varför cyanobakterier bildar toxiner och många hypoteser har lagts fram (Sivonen, 2009; de Figueiredo, 2004). Man tänker sig att det måste finnas en biologisk mening med toxinerna eftersom bakterierna förbrukar mycket energi då de producerar enzymkomplexen, som behövs för att syntetisera de toxiska substanserna (Sivonen, 2009; Bickel & Lyck, 2001). Många cyanobakterier har förmåga att bilda flera olika typer av bioaktiva föreningar, men det är ovanligt att de producerar både hepatotoxiner och neurotoxiner (Sivonen, 2009).

Det finns studier som indikerar att cyanotoxiner kan fungera som ett kemiskt försvar mot betande zooplankton (Kurmayer & Jüttner, 1999; Henning et al., 2001) eller att de kan ha en hämmande effekt gentemot andra konkurrerande alger (Kearns & Hunter, 2001), samtidigt som de reglerar endogena proteinfosfataser eller fungerar som kvävereserv.

En teori som presenterats är att eftersom de klassiska cyanobakteriella hepatotoxinerna och neurotoxinerna är giftiga för eukaryota organismer torde de ha utvecklats som ett försvar mot eukaryota predatorer, förslagsvis herbivora zooplankton (Sivonen, 2009). Cyanobakterier producerade emellertid högst antagligen den här typen av toxiner långt innan eukaryota organismer uppstod, vilket indikerar att cyanotoxinerna initialt tjänat ett annat syfte. Det är likväl fullt möjligt att cyanotoxiner uppstod senare än själva cyanobakterierna och att de då utgjorde ett led i försvaret mot de nya predatorer som tagit plats på den evolutionära scenen. En annan faktor som talar för predatorteorin är att cyanotoxiner som frisätts i vatten späds ut och därmed förlorar i effektivitet, vilket skulle kunna tyda på att meningen är att gifterna ska utöva sin effekt först när cyanobakterien blir uppäten. Dock hävdas det att cyanobakterier inte är en optimal födokälla för predatorer och många cyanobakterier tillämpar dessutom andra metoder för att skydda sig mot fiender, exempelvis medelst långa filament eller genom att bilda stora kolonier (Sivonen, 2009).

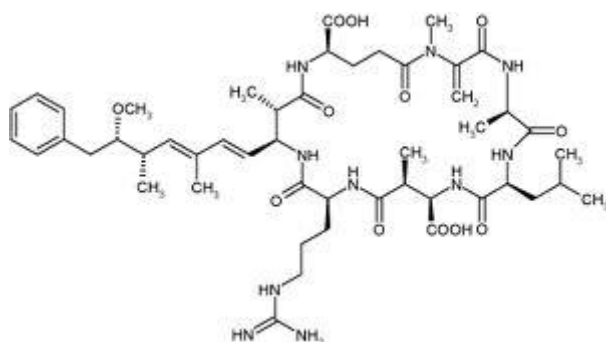
En annan hypotes som framlagts är att cyanotoxinerna spelar en roll i regleringen av cellens metabolism eller fungerar som signalmolekyler. Denna teori baseras bl.a. på det faktum att man har identifierat en microcystinvariant som reglerar sin egen och andra proteiners biosyntes. Varför det skulle behövas så höga toxinhalt för att reglera cellprocesser och hur dessa processer styrs hos icke toxiska cyanobakterier är motargument som man ännu inte funnit några förklaringar till och därmed inte kunnat förkasta (Sivonen, 2009)

## Microcystiner och nodulariner

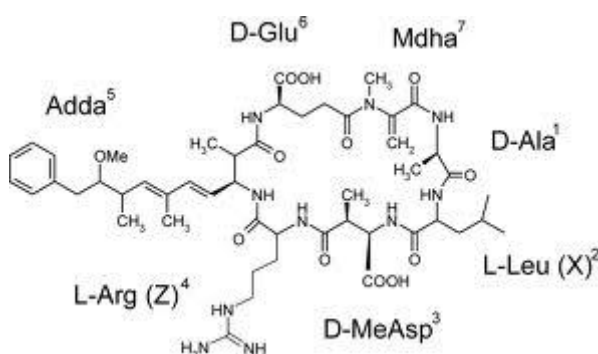
*Microcystis* spp. utgör den största gruppen inom cyanobakterierna (Sivonen, 2009). *Nodularia spumigena* förekommer i brackvatten och tillhör en av de vanligaste cyanobakterierna i de årligen återkommande algbloomingarna i Östersjön (Kononen et al., 1998). Microcystiner och nodulariner kan båda orsaka akut förgiftning, men de fungerar också som s.k. tumör-promotorer och kan därmed ge upphov till cancer vid långvarig kronisk exponering (Ueno et al., 1996; Zhou, 2002; Sivonen, 2009). Man har sett kopplingar mellan kronisk exponering för cyanotoxiner i dricksvatten och ökad förekomst av primär levercancer samt colorectalcancer (Ueno et al., 1996; Zhou, 2002). Globalt sett är microcystiner de cyanobakterietoxiner som är vanligast förekommande i samband med algbloomingar. Microcystiner är ringformade heptapeptider, vilket innebär att de byggs upp av 7 aminosyror. Microcystinerna är namngivna efter den kolonibildande arten *Microcystis aeruginosa*, som är den cyanobakterie hos vilken toxinet först isolerades. Microcystiner produceras emellertid också av filamentösa *Anabaena*-, *Planktothrix/Oscillatoria*-, *Anabaenopsis*-, *Nostoc*- och *Aphanizomenon*-arter samt även av arter tillhörande det terrestra släktet *Hapalosiphon* (Eriksson et al. 1990; Codd et al., 1995; Dow & Sowboda, 2000; Kaebernick & Neilan, 2001).

Microcystinernas kemiska uppbyggnad kan variera och för närvarande är åtminstone 86 olika varianter av microcystiner kända (Sivonen, 2009). Den generella strukturen hos microcystiner är cyklo(d-alanin1-X2-d-MeAsp3-Z4-Adda5-d-glutamat6-Mdha7), där X och Z är variabla l-aminosyror, d-MeAsp3 står för d-erythro-β-metylasparaginsyra och Mdha är N-metyldehydroalanin (Figur 1). Aminosyran Adda (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetyl-10-fenyldeca-4,6-dienolsyra, har endast återfunnits i cyanobakteriella hepatotoxiner och anses vara orsaken till molekylen hepatotoxicitet (Sivonen, 2009; Dawson, 1998). Alla de ingående aminosyrorerna kan variera liksom graden av metylering eller demetylering och olika typer av microcystiner namnges ofta utifrån grad av metylering och demetylering samt aminosyrauppsättning (Sivonen, 2009). Microcystin-LR är således en toxinvariant som har aminosyran leucin (L) i position 2 och arginin (R) i position 4, medan [d-Asp3]microcystin är beteckningen för en variant där aminosyran i position 3 saknar metylgrupp. Microcystin-LR är en av de vanligaste och mest toxiska varianterna och är därmed en av de mest studerade microcystinerna (Dow & Sowboda, 2000). Andra vanliga varianter är microcystin-RR, microcystin-YR och microcystin-LA.

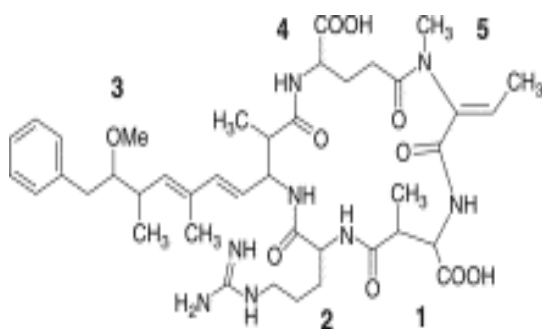
Den cykliska pentaheptiden nodularin, som är vanlig i brackvatten, produceras endast av *Nodularia spumigena* och man har bara funnit ett fåtal olika nodularinvarianter i naturen (Kononen, 1998; Sivonen, 2009). *Nodularia spumigena* finns i Östersjön, men även i saltvattenssjöar och flodmynningar i bl.a. Australien. De årliga algbloomingarna i Östersjön är troligen de största massförekomsterna av hepatotoxiska cyanobakterier i världen och *Nodularia spumigena* förekommer ofta i samband med dessa. Den kemiska strukturen hos nodularin är cyklo(d-MeAsp1-l-arginin2-Adda3-d-glutamat4-Mdhhb5), där Mdhhb är 2-(methylamino)-2-dehydrobutyrat och nodularin har såtillvida en hel del strukturella likheter med microcystiner (Rinehart et al., 1988), (Figur 2).



Figur 1. Den generella kemiska strukturformeln hos microcystin. Microcystinernas kemiska uppbyggnad kan variera. Den generella strukturen hos microcystiner är cyklo(d-alanin1-X2-d-MeAsp3-Z4-Adda5-d-glutamat6-Mdha7), där X och Z är variabla l-aminosyror, d-MeAsp3 står för d-erythro- $\beta$ -metylasparaginsyra och Mdha är N-metyldehydroalanin (Baserad på <http://www.enzolifesciences.com/ALX-350-012/microcystin-lr/>).



Figur 2. Den kemiska strukturformeln hos microcystin-LR. Microcystin-LR är en av de vanligaste och mest toxiska varianterna. Aminosyran leucin (L) är i position 2 och arginin (R) i position 4. (Baserad på [www.biomedcentral.com](http://www.biomedcentral.com) och Fewer et al. BMC Evolutionary Biology 2007 7:183).



Figur 3. Den kemiska strukturen hos nodularin, en cyanobakterieproducerad hepatotoxisk cyklisk pentapeptid, som finns framför allt i brackvatten. Strukturformeln är cyklo(*d*-MeAsp1-*l*-arginin2-Adda3-*d*-glutamat4-Mdhb5), Mdhb är 2-(metylamino)-2-dehydrobutyrat. (Baserad på <http://www.esf.edu/merhab/toxins.asp>)

Microcystiner och nodulariner är mycket potenta hepatotoxiner. Toxiciteten vid peroralt intag av cyanotoxiner är lägre än vid intravenös administration eller vid inhalation av toxininnehållande aerosol (WHO, 2003). Microcystin-LR och nodularin anses vara de mest toxiska varianterna (Sivonen, 2009). Hos möss ligger LD<sub>50</sub> för microcystin-LR vid intraperitoneal (ip) injektion vanligen på 50 µg/kg kroppsvikt (Dow & Swoboda, 2000), men den kan variera från 25 µg/kg till 125 µg/kg (Dawson, 1998; WHO, 1998). LD<sub>50</sub> vid peroral administration är 5000 µg/kg hos möss (WHO, 1998). Hos gris är letal dos microcystin-LR vid ip administration 72 µg/kg (Beasley et al., 2000). Leverskador och inre blödningar med påföljande hemorragisk chock utgör dödsorsaken vid akut förgiftning.

Vid kronisk administrering har man dock observerat att microcystiner, genom att inhibera fosfataserna PP1 och PP2A, två viktiga enzymer involverade i tumorsuppression, kan ge upphov till levercancer hos däggdjur (Ito et al., 1997). Ito och hans kollegor visade att möss som exponerades för subletala doser av microcystin-LR genom ip injektioner, utvecklade tumörer i form av neoplastiska noduli i levern. Fosfatasinhibitionen inducerar oxidativa DNA-skador som sedan ger upphov till tumöromvandling av cellerna (Zegura et al., 2003). Effekter av kronisk exponering, i form av ökad levervikt och hepatohistologiska skador, har setts hos råttor som exponerats för låga koncentrationer microcystin i dricksvattnet i ett försök som sträckte sig över en period på 28 dagar (Heinze, 1999). Milutinovi et al (2003) konstaterar att råttor som utsatts för kronisk exponering av microcystin, utvecklar skador på njurarna. För att microcystinerna ska kunna utöva sin hämmande effekt på serin/theonin-specifikt proteinfosfat 1 och 2A krävs det att aminosyran adda är i rätt konfiguration (Sivonen, 2009) eftersom toxinet annars inte kan blockera det aktiva området på enzymet. Microcystiner bildar, till skillnad från nodulariner, kovalenta bindningar med enzymet.



## Patologi och fallrapporter

Hos däggdjur är microcystiner selektiva för leverceller, i vilka de irreversibelt inhiberar serin/threonin-proteinfosfataserna PP1 och PP2A (Dawson, 1998). Detta leder sedermera till disintegration av hepatocytstrukturen, apoptos, levernekros och inre blödningar i levern, vilket kan leda till hemorragisk chock och död (Dow and Swoboda, 2000). Cyanotoxiner, som intas per os, transporteras över tarmväggen i ileum och vidare in i blodomloppet via ett transportprotein som finns i tunntarmens vägg samt i leverceller och som normalt transporterar gallsyror tillbaka till blodet. Gallsyratransportören är en del av det enterohepatiska kretsloppet. Microcystiner binder specifikt till hepatocyter och absorberas aktivt av levercellerna (Dawson, 1998; Dow & Swoboda, 2000). Inuti hepatocyterna bildar cyanotoxinerna addukter med fosfataserna PP1 och PP2A från cytoplasman och cellkärnan, vilket gör att cellstrukturen skadas (Fitzgerald, 2001). Vid akut cyanotoxinförgiftning uppträder oftast symtomen snabbt och inkluderar svaghet, ibland prostration (extrem utmattning och avsaknad av energi), utmärgling/anorexi, kalla extremiteter, bleka slemhinnor, apati, respiratoriska problem, gastroenterit, kräkningar och diarré, med påföljande levernekros och döden inträffar relativt kvickt, i grava fall ofta inom några timmar, till följd av hemorragisk chock (McGavin et al., 2007; Codd et al., 1995; Codd, 2000; Dow & Swoboda, 2000; Gorham & Carmichael, 1988). Makroskopiska lesioner i inre organ ses i form av en röd och svullen, hemorragisk lever samt som hemorragisk gastroenterit (McGavin et al., 2007). Histologiskt ses zonal eller till och med massiv levernekros och rikliga inre blödningar. Djur som överlever den akuta fasen kan sedermera utveckla tecken på kronisk leversjukdom. Det finns även cyanobakterier som påverkar nervsystemet. Till dessa hör arten *Prototecha*.

Förgiftning orsakad av cyanotoxiner har setts hos många olika djurslag, både vilda och tama, så som nötkreatur, hästar, får, grisar, fåglar, hundar och fiskar (Fitzgerald & Poppenga, 1993). Risken för förgiftning hos djur är störst när vindförhållandena är sådana att cyanobakterierna ansamlas vid stränder där djuren svalkar sig i vattnet, släcker törsten och betar i vattenbrynet. Fitzgerald och Poppenga (1993) redogör för det första fallet av cyanotoxinförgiftning hos djur i Michigan, USA och framställer samtidigt ett standardprotokoll för diagnosticering av cyanotoxinförgiftning. I en grupp på 30 kvi­gor av rasen Holstein dog plötsligt 3 djur under ett dygn i mitten av oktober. Två av kvigorna hittades döda på betet, medan den tredje var svag, inkapabel att resa sig och anorektisk. Den sjuka kvigan fick understöd­jande behandling, men avled tidigt dagen därpå. En fjärde kviga som uppvisade kliniska symtom behandlades framgångsrikt av veterinär med aktivt kol peroralt i ett försök att absorbera det gift som ännu inte tagits upp från magtarmkanalen. 72 timmar efter behandlingen var kvigan återställd och hade normal aptit igen.

De två självdöda djuren obducerades men enbart enstaka makroskopiska fynd; i form av spridda epi- och endokardiella blödningar, gjordes. Vid mikroskopering konstaterades dock diffus centrilobulär till submassiv leverdegeneration med sinusoidal dilatation och stas (blodfyllda sinusoider) hos båda djuren. Vattenprover från den aktuella dammen på betet undersöktes. Man fann stora mängder alger och kunde konstatera att de till 95 % utgjordes av *Microcystis aeruginosa*.



För att snabbt kunna bekräfta de starka misstankarna om cyanotoxinförgiftning sattes en bioassay upp, baserad på 12 veckor gamla BALB/c möss. Vattenprover frystes in och tinades upp igen för att förmå cyanobakteriecellerna att brista och frigöra toxiner. Därefter centrifugerades proverna i 9500 x g i 10 minuter. 1 ml av supernatanten injicerades ip i 5 möss. Två kontrollmöss injicerades med saltlösning. Inom 50 minuter var alla 5 testmöss, som fått supernatanten döda, medan kontrollmössen var helt opåverkade. Vid obduktionen hade alla testmössen en diffust svullen och blodfylld lever med en medelvikt på 2,5 g, vilket kan jämföras med kontrollmössens leverar som vägde i medel 1,65 g och var normala i färg och storlek. Levern hos testmössen vägde alltså i medeltal hela 51 % mer jämfört med kontrollerna. Mikroskopiskt kunde man se samma patologiska förändringar i testmössens leverparenkym som hos de avlidna kvigorna. Kontrollmössens leverar uppvisade inga morfologiska eller patologiska förändringar.

De flesta förgiftningsfall äger rum under sommarmånaderna i samband med extra varmt och soligt väder, men det förekommer också förgiftningsfall under andra tider på året. Frazier et al (1998) beskriver microcystinförgiftning hos nötkreatur så sent som i november och dessutom i samband med en för årstiden ovanligt kall period. Djuren insjuknade med akuta förgiftningssymtom på betet i södra Georgia, USA. I en grupp på 50 djur hittades 2 vuxna kor döda på betet, medan 2 andra kor var svaga och oförmögna att resa sig, varav det ena djuret dog efter 3 timmar. Djuren var nyligen avmaskade och var i utmärkt kondition. Man noterade dock att några av korna hade gröna fläckar av algmaterial på mulen och att en damm på betet var överväxt med alger. De resterande kreaturen flyttades till ett annat bete och därmed förhindrades fler förgiftningsfall. Ett blodprov som togs från ett av djuren visade förhöjt Aspartataminotransferas (ASAT) 429 IU/L (normalvärde 40 – 130), bilirubin 0,6 mg/100 ml (normalvärde 0,1 – 0,4) samt kreatininfosfokinas (CK) 5685 IU/L (normalvärde 57 – 280).

Vid obduktionerna, som utfördes på två av de avlidna djuren fann man echymoser i serosan på hjärtat, löpmagen och våmmen. Dessutom fann man mer ovanliga patologiska förändringar i form av ödem i mesenteriet och peritoneal effusion. Mesenteriet samt löpmags- och tarmväggarna var kraftigt ödematösa och ca 1 liter blodblandad vätska fanns i bukhålan hos båda korna. Levern var mindre än förväntat hos båda djuren, vilket tydliggjordes av att leverkapseln hade blivit skrynklad. På snittytor i leverparenkymet sågs spridda punktformade ljusa härdar. Mikroskopisk undersökning av levervävnaden påvisade grava multifokala atrofiska förändringar, moderat hepatocellulär dissociation och multifokal centrilobulär till submassiv nekros med dilatation av sinusoider. Hos båda djuren sågs moderat hemosideros och retention av galla samt mild atrofi av Kupfferceller. Lymfkärl i tarmväggarna i tunn- och grovtarmarna var dilaterade och mesenteriet var, som tidigare nämnts, kraftigt ödemastöst. Även lungorna, löpmagen och gallblåsans vägg var ödematösa, men i mild grad. I njurarna från en av korna sågs mild multifokal tubulär nekros. Många organ uppvisade degenerativa förändringar och hyalinsiering av intima- och medialagren i artärer och arterioler.

Det faktum att man kunde koppla multipla perakuta dödsfall och det talande obduktionsfyndet levernekros till exponering av *Microcystis aeruginosa* var starka indikatorer på att det verkligen rörde sig om cyanotoxinförgiftning i fallet i södra Georgia. De kraftiga ödemen, distributionen av lesionerna och årstiden var emellertid inte typiska för microcystinförgiftning. För att konfirmera misstankarna om cyanotoxinförgiftning satte man upp en bioassay i vilken 2 stycken 12 veckor gamla möss exponerades för cyanotoxinerna i dammvattnet enligt samma protokoll som beskrivits ovan. Båda mössen dog inom 12 timmar. Vid obduktion fann man att levern hos båda mössen var mindre än hos kontroldjur av samma ålder och histologiskt sågs multifokal hepatisk degeneration och atrofi med multifokal cellulär dissociation. Mesenteriet och tarmmucosan var ödematösa och i många artärer och arterioler sågs milda degenerativa förändringar i intima och media. Kontrollmössen som fick dammvatten, från vilket cyanobakterierna hade renats bort, var fortfarande vid liv och välmående 5 dagar senare.

Det är tänkvärt att det inte fanns några dokumenterade problem med algväxt i den aktuella dammen under de senaste 20 åren, men att markägaren två veckor innan förgiftningarna ägde rum hade gödlat ett bete nära dammen med ett kväverikt gödselmedel. Strax därefter föll kraftiga regn. En tydlig koppling mellan eutrofiering och cyanobakterieförekomst.

*Tabell 1. Sammanställning av fallrapporter av cyanotokikos hos djur. ND = not detected. Baserad på Sivonen (2009).*

Plats och årtal	Drabbade djurslag	Toxin som detekterats, koncentrationer (metoder)	Toxin producent
<b>Lake Alexandrina, Australien, 1878</b>	Får, hästar, hundar, grisar dog	Nodularin	<i>Nodularia spumigena</i>
<b>Sjön Vesijärvi, Finland, 1928</b>	40 kor dog	Neurotoxin	<i>Anabaena</i>
<b>Grayling Arm of the Hebgen Lake, Montana, USA, juni–juli 1977</b>	8 hundar och 30 nötkreatur	Anatoxin-a: (mus bioassay, jämförelse anatoxin-a)	<i>Anabaena flos-aquae</i>
<b>Roagland, Norge, 1978</b>	4 kvigor dog	Microcystiner	<i>Microcystis aeruginosa</i>

Plats och årtal	Drabbade djurslag	Toxin som detekterats, koncentrationer (metoder)	Toxin producent
<b>Barakologdi Viltreservat, Sydafrika, 1979</b>	3 noshörningar dog	Microcystiner	<i>Microcystis aeruginosa</i>
<b>Östersjön, 1975, 1982–84</b>	Ett flertal hundar, 16 unga nötkreatur dog	Nodularin	<i>Nodularia spumigena</i>
<b>Sjön Säaskjärvi, Finland, augusti 1985</b>	2 kor dog	Anatoxin-a: 2.8 mg/g t.s. blomningsmaterial (GC-MS, mus bioassay)	<i>Anabaena spp.</i>
<b>Steele Lake, Edmonton, Alberta, Canada, augusti 1985</b>	Över 1000 fladdermöss, 24 gräsand och am. bläsand	Anatoxin-a: (GC-MS)	<i>Anabaena flos-aquae</i>
<b>Wisconsin, USA, 1985</b>	9 kor dog	Microcystiner: Blomningsmaterial testades på en frisk kviga. Lethal dose 10 mg/kg	<i>Microcystis aeruginosa</i>
<b>Åland Islands, Finland, 1985</b>	Fisk, fåglar, bisamrättor dog	Microcystiner	<i>Oscillatoria/Planktothrix</i>
<b>Richmond Lake, SD, USA, augusti –september 1985</b>	14 hundar, 2 kalvar, fisk, am.gråhäger, 1 bisamrätta dog	Anatoxin-a(S) (mus bioassay, HPLC, acetylcholinesteras inhibitions assay)	<i>Anabaena flos-aquae</i>

Plats och årtal	Drabbade djurslag	Toxin som detekterats, koncentrationer (metoder)	Toxin producent
<b>Sjön Säytejärvi, Finland, augusti 1986</b>	3 kor dog	Anatoxin-a: 3.7 mg/g t.s. blomningsmaterial (HPLC och GC-MS, mus bioassay)	<i>Anabaena spp.</i>
<b>Alberta, Canada, 1986</b>	16 kor dog	Anatoxin-a: (GC-MS)	ND (mest troligt <i>Anabaena flos-aquae</i> )
<b>Pond near Griggsville, IL, USA, september 1986</b>	4 suggor, 1galt, and 8 yngre grisar	Anatoxin-a(S) (mus bioassay, acetylcholinesteras inhibitions assay)	<i>Anabaena flos-aquae</i>
<b>Rutland Water, UK, 1989</b>	20 får och 14 hundar	Microcystiner	<i>Microcystis aeruginosa</i>
<b>Darling river, Australien, 1990</b>	Ca 2000 nötkreatur och får dog	Saxitoxiner (mus bioassay; slutligen identifierad genom HPLC och MS)	<i>Anabaena circinalis</i>
<b>Caragh Lake, Irland, 1992, 1993, 1994</b>	Ett flertal hundar dog	Anatoxin-a: 444 µg/l sjövattnet (HPLC)	<i>Oscillatoria, benthic</i>
<b>Sjön Knud sø, Danmark, 1993, 1994 (juni-juli)</b>	över 20 fåglar, 1 hund dog	Anatoxin-a(S) 0.8–3.3 mg anatoxin-a(S) equivalenter per gram (mus bioassay, acetylcholinesteras inhibition assay HPLC, MS, NMR)	<i>Anabaena lemmermannii</i>

Plats och årtal	Drabbade djurslag	Toxin som detekterats, koncentrationer (metoder)	Toxin producent
<b>Australien, 1994</b>	14 får dog	Saxitoxiner, 1.7–2.5 mg/g t.s. blomnings-material	<i>Anabaena circinalis</i>
<b>Queensland, Australien, 1997</b>	1 ko, 3 kalvar dog	Cylindrospermopsin: 1.5 mg/g blomningsmaterial (LC-MS); 153 mg/kg (mus bioassay)	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>
<b>Georgia, USA, 1998</b>	3 kvigor dog	Microcystin	<i>Microcystis aeruginosa</i>
<b>La Loue Rivers, Frankrike, 2003</b>	2 hundar dog	Anatoxin-a: 8 mg/g t.s. biofilm extrakt (HPLC-UV, ESI MS/MS)	<i>Phormidium favosum</i> , <i>benthic</i>
<b>North Island, New Zealand, 2005</b>	5 hundar dog	Anatoxin-a: 0.5–27 µg/kg v.v.av prover från bentiska algmattor; Homoanatoxin-a: 51–4400 µg/kg v.v. (LC-MS)	<i>Phormidium</i> , <i>benthic</i>
<b>Lake Oubeira, Algeriet, 2005</b>	Sköldpaddor dog	Microcystiner: 1.1 mg/g blomningsmaterial; lever 1.1 mg, viscera 0.04 mg/g t.s. vävnad (PPIA, LC-MS)	<i>Microcystis spp.</i>

## Hälsorisker kopplade till toxiska cyanobakterier

Massförekomster av giftiga cyanobakterier är dessvärre ett vanligt förekommande fenomen globalt sett (de Figueiredo, 2004; Karjalainen, 2007; Sivonen, 2009). I tempererade regioner uppstår algblomningar säsongsbundet, medan de kan fortgå nästintill året runt där klimatet är varmare. Människor kan exponeras för microcystiner via en direkt källa så som dricksvattnet (Ueno et al., 1996; WHO, 1998; Zhou et al., 2002), genom rekreation vid vatten (WHO, 2003), genom hemodialys (Pouria et al., 1998) eller indirekt via livsmedel eller dylikt (Williams et al., 1997). WHO har fastställt ett gränsvärde för högsta tillåtna koncentration av microcystin-LR i dricksvatten till 1 µg/l (WHO, 1998). Man har dock sett en påverkan på cytochrom c i mitokondrier redan vid denna relativt låga dos microcystin (Majsterek et al., 2004). Den kunskap som finns om hur cyanotoxiner påverkar människor baserar sig på försök gjorda på laboratoriedjur samt på epidemiologiska studier och utifrån de förgiftningsfall som rapporterats in från olika platser världen över kan man sluta sig till att cyanotoxiner har både akuta (WHO, 1998) och kroniska (Ueno et al., 1996; Zhou et al., 2002) effekter på människor och att de även kan orsaka dödsfall (Pouria et al., 1998). Barn och äldre samt människor med vissa typer av sjukdomar, t.ex. hepatit-B, tillhör riskgrupper som är extra känsliga för cyanotoxikoz (Fitzgerald, 2001).

Eftersom cyanotoxiner snabbt ger irreversibla och allvarliga leverskador är effektiv terapi svår att genomföra när skadan väl är skedd. Även profylax är komplicerad. I olika studier föreslås allt från snabbt insatt gastrolavage (tarmsköljning) till behandling med antikroppar, substanser som blockerar upptag i levercellerna samt antibiotika i form av rifampin (Gorham & Carmichael, 1988; Nagata et al., 1995; Dawson, 1998). Gehringer et al (2003) visade att den membranaktiva antioxidanten vitamin E, administrerad via kosttillskott, skyddar mot toxiska effekter vid kronisk exponering för microcystin-LR. Olika gröna fodermedel, såsom betesgräs och tidigt skördat ensilage, innehåller rikligt med E-vitamin. I en svensk studie gjord av Hakkarainen & Pehrson (1987) analyserades E-vitamin i olika fodermedel och man kunde konstatera att halten var betydligt högre i färskt gräs och i ensilage än i hö. Dessa fodermedel innehöll också betydligt högre halter av fleromättade fettsyror än vad höet gjorde. Liknande skillnader i E-vitamininnehåll sågs i en finsk studie 1996 och i denna studie kunde man även visa på effekten hos djuren. Kor som åt hö hade 2.8 mg E-vitamin per liter serum. Motsvarande siffra för kor på ensilagefoderstat var 6.5 mg och på bete hade de 8.2 mg/l (Jukola et al, 1996).

Systemiska övervakningsprogram har visat att toxiska cyanobakterier ofta förekommer i vattenreservoarer, vilket har lett till ett ökat intresse och prioritet från forskare och företag som arbetar inom området (Sivonen, 2009; de Figueiredo et al., 2004). Det finns effektiva metoder för att rena vatten från både toxiner och cyanobakterieceller (Sivonen, 2009). Toxinerna är i de flesta fall verksamma först efter att de frigjorts i vattnet i samband med att cyanobakteriecellen lyserat. Kemisk flotationsteknik (chemical flocculation) har visat sig vara ett bra sätt för att avlägsna cyanobakterieceller från vatten. För att avlägsna fria toxiner krävs aktivt kol och ozonbehandling (ozonation). Behandling med aktivt kol är dock inte alltid tillräckligt för att avlägsna alla toxiner och denna osäkerhetsfaktor utgör naturligtvis en risk.

Microcystiner och nodularin är cykliska peptider och de är mycket resistent mot degradering. De förstörs inte ens av kokande vatten. De omintetgörs dock av biodegradering och ett flertal bakteriestammar som förmår bryta ner toxinerna har identifierats. Biodegraderingshastigheten är starkt relaterad till vattentemperatur. Solljus har en degraderande effekt på vissa toxiner såsom anatoxin-a. Neurotoxiner bryts lättare ned än hepatotoxiner.

Växter som odlas för humankonsumtion och som bevattnas med cyanotoxininnehållande vatten, drabbas av hämmad tillväxt, men kan också ta upp toxiner och kan därigenom utgöra ett hot mot människors hälsa. Man har exempelvis dokumenterat att salladen *Lactuca sativa* absorberar microcystiner från vattnet vid bevattning (Codd et al., 1999). Det också ett känt faktum att toxiner kan ackumuleras i djur; exempelvis musslor och andra skaldjur, men även fisk, som livnär sig på plankton som de fångar genom att filtrera stora mängder vatten (Williams et al., 1997; Fischer & Dietrich, 2000). Toxinerna verkar också kunna finnas kvar i musslor även efter att algblomning upphört, vilket förklaras med att toxiner utsöndras med faeces och sedan återkontaminerar skaldjuren (Amorim & Vasconcelos, 1999). Man har också visat att somliga substanser kan transformeras till mer toxiska varianter då de passerar genom dylika biologiska system (Sivonen, 2009). Hos fiskar lagras cyanotoxiner ofta in i framför allt lever och njurar (Mohamed et al., 2003), men det finns också fiskarter som lagrar in toxinerna i muskelvävnad och som därigenom utgör ett mer påtagligt hot mot människor som konsumerar kontaminerade fiskprodukter (Magalhães et al., 2001).

Mycket är fortfarande okänt när det gäller kontamination av livsmedel, baserade på produkter från nötkreatur, som en följd av att djuren exponerats för subkliniska doser av cyanotoxiner (Orr et al., 2001). Orr et al (2003) undersökte om spår av cyanotoxin kunde detekteras i blodprover och leverbiopsier från köttdjur som exponerats för dricksvatten kontaminerat med  $1 \times 10^5$  celler/ml av cyanobakterien *Microcystis aeruginosa*. Försöket pågick under en period på 28 dagar och man kunde inte påvisa toxiner i vare sig blod eller levervävnad och ingen stegring i blodvärden som skulle kunna indikera leverskada sågs. Slutsatsen var att köttprodukter från djur, som utsatts för motsvarande toxinexponering, inte är olämpliga för humankonsumtion.

Det finns ett antal publicerade studier, i vilka man har försökt utreda huruvida cyanotoxiner skulle kunna utsöndras i mjölken hos lakterande kor och om toxinerna sålunda skulle kunna utgöra ett livsmedelsburet hot mot människor. Det är inte fullständigt känt hur cyanotoxiner omsätts i kroppen hos en mjölkko som intagit en subletal dos (Orr et al., 2001). Orr et al (2001) genomförde en studie där 4 lakterande kor av rasen Holstein under 21 dagars tid försågs med vatten innehållande  $1 \times 10^5$  celler/ml av *Microcystin aeruginosa*. Djuren konsumerade upp emot 15 mg microcystin-LR per dag, men inga spår av cyanotoxiner kunde detekteras i mjölken. I en liknande studie på Holsteinkor som hade ett dagligt intag på 7,6 mg microcystin-LR under 4 veckor, sågs ingen påverkan på levern och inga spår av toxin fanns i mjölken (Feiz et al., 2002)

Cyanobakterietoxiner är vattenlösliga och lagras därmed inte in i fettvävnad i motsats till exempelvis diklordifenyltrikloretan (DDT) (Sivonen, 2009). Hepatotoxiner ansamlas i levern hos fisk och sjöfågel och därför rekommenderas att man undviker att äta lever och inälvor från sjöfågel och fisk som kommer från vatten där algbloomning pågår. Cyanotoxiner har också hittats i algbaserade kosttillskott. Att bada i vattendrag där större mängder giftiga cyanobakterier förekommer kan naturligtvis orsaka förgiftning, men förgiftningsfall har även förekommit i samband med vattenskidåkning (WHO, 2003). Även om man inte vistas särskilt länge i vattnet då man åker vattenskidor, andas man ofrånkomligen in en toxininnehållande aerosol. Inhalation av torkade cyanobakterier eller kontaminerat vatten är farligare än att exponeras för cyanotoxiner via oralt intag. WHO har tagit fram ett system med tre hälsorisknivåer, baserat på cyanobakteriedensitet, för vatten som används för rekreation (WHO, 2003).

De allvarligaste humana förgiftningsfallen har rapporterats från Australien och Brasilien. Det mystiska sjukdomsutbrottet på Palm Island i Australien 1980 där 140 barn och 10 vuxna drabbades, visade sig senare vara orsakat av cyanobakterietoxinet cylindrospermopsin i dricksvattnet (Byth, 1980). Vattnet hade behandlats med algicider, men innehöll trots detta så höga halter av cyanotoxiner att människor blev sjuka. År 1996 drabbades 131 patienter på en dialysklinik i brasilianska Caruaru av akut cyanotoxicos (Jochimsen et al., 1998). 56 personer avled i sviterna av grav hepatit som orsakats av microcystiner i dricksvattnet och de övriga som exponerats uppvisade typiska symtom som illamående, kräkningar och smärta associerad till leverförstoring. Kliniken försågs med vatten från en vattenreservoar där stora mängder cyanobakterier förekom och filtersystemet med aktivt kol som skulle rena vattnet var inte tillräckligt effektivt. Man fann microcystiner i kol-, sand- och jonbytesfilter samt i blodserum och levervävnad hos de avlidna patienterna.

### Förhindra problem orsakade av toxiska cyanobakterier

Den ständigt växande globala befolkningen och den påföljande intensifieringen av jordbruket och industrin, i kombination med kortsiktig användning av planetens vattenresurser, har lett fram till dagens problem med övergödning av ytvatten som används för rekreation och som dricksvattenkällor (de Figueiredo et al., 2004). Algbloomningar blir allt vanligare runtom i världen; en tydlig och oroande respons på klimatförändringar som högre temperaturer och pH-värden, lägre turbulens och ökat tillflöde av näringsämnen, huvudsakligen fosfor och kväve. Massförekomster av toxinproducerande cyanobakterier har blivit ett allvarligt problem eftersom fler och fler arter, under de senaste decennierna, har visat sig kunna producera potenta toxiner (Gorham & Carmichel, 1988; Codd et al., 1995; Codd, 2000; Briand et al., 2003; Haider et al., 2003; WHO, 2003).

Motverkande av övergödning av vattendrag är ett av de viktigaste och mest effektiva sätten att förhindra algbloomningar (Sivonen, 2009). Eutrofa vatten härbärgerar betydligt större mängder toxiska cyanobakterier än oligotrofa (näringsmässigt balanserade) vatten. Studier har visat att fosforrika vatten inte bara leder till en ökad tillväxt hos cyanobakterier, utan även stimulerar till en större toxinproduktion. I kväverika vatten kan cyanobakteriefloran ändras från kvävefixerande arter till icke-kvävefixerande arter som *Microcystis* eller *Planktothrix*, vilka ofta representeras av toxiska stammar.



Vatten som drabbas av massiva algbloomingar bör inte användas i vare sig konsumtions- eller rekreationssyfte. I många länder upprätthålls intensiv övervakning av vattenkvaliteten vid badstränder under badsäsong och badplatser som inte håller måttet stängs av. Om vattentäkter, där förekomst av giftiga cyanobakterier konstaterats, används för framställning av dricksvatten måste mycket effektiva och säkra reningsmetoder installeras för att garantera vattenkvaliteten vid fortsatt dricksvattenproduktion.

En annan mycket viktig faktor, som är nära sammanlänkad med övergödningen av Östersjön, är utfiskning av rovfisk, huvudsakligen torsk (Hansson, 2008). Då rovfisken försvinner skapas obalans i Östersjöns ekosystem och den planktivora (planktonätande) bytesfisken, huvudsakligen skarpsill och strömming, ökar explosionsartat. Det i sin tur leder till att zooplankton, som i Östersjön huvudsakligen representeras av copepoder och som utgör bytesfiskens huvudsakliga föda, sjunker i antal. Betarna (zooplankton) livnär sig på fytoplankton och när betarna reduceras kommer fytoplankton, däribland cyanobakterier, att öka. Utfiskning av torsk och andra rovfiskar leder alltså indirekt till kraftigare algbloomingar. Mer frekventa och omfattande algbloomingar föranleder också en utbredning av Östersjöns syrefria botten eftersom nedbrytningsprocessen av döende plankton slukar syre då de sjunker och sedimenterar på havsbotten. Mer fosfor, som finns bundet i syrerikt botten sediment, kommer således att frigöras och späda på eutrofieringen ytterligare. Det är en ond cirkel som resulterar i allt mer omfångsrika toxiska algbloomingar och större risker för människor och djur.

Vissa forskare menar att man genom att kvotera och reglera fisket; helst stoppa torskfisket helt, samt eventuellt genom olika biomanipuleringsmetoder som t.ex. utsättning av rovfisk, reduktionsfiske av planktivora fiskarter, uppbyggnad av musselodlingar etc., skulle kunna få stopp på den alarmerande utvecklingen i Östersjön. WHO tillhandahåller riktgivande gränsvärden för cyanotoxinnivåer för dricksvatten såväl som för badvatten (WHO, 1998; WHO, 2003). Ett viktigt led i att skydda djurs och människors hälsa är att skapa medvetenhet hos allmänheten om hur giftiga och farliga algbloomingar kan vara.

### **Faktorer som påverkar toxinproduktionen**

Många cyanobakterier kan producera flera olika toxinvarianter eller bioaktiva substanser samtidigt (Sivonen, 2009). Dock är det mycket ovanligt att en art kan producera både hepatotoxin och neurotoxin. In vitro studier visar att cyanobakterier ofta producerar toxin kontinuerligt. Genom att manipulera olika miljöfaktorer kan man ändra förutsättningarna för cyanobakterierna men man har ännu inte lyckats stoppa hepatotoxinproduktionen helt och hållet. Det är ett väletablerat faktum att miljöfaktorer påverkar cyanobakteriernas toxinsyntes. För att utvärdera diverse miljöfaktorer påverkan på cyanobakteriernas tillväxt och toxinproduktion utnyttjar man ofta följande parametrar; odlingens ålder, temperatur, ljusförhållanden, näringssammansättning och salthalt, pH och mikronäringsämnen. Hepatotoxiner samt anatoxin-a är huvudsakligen intracellulärt lokaliserade när tillväxtförhållanden är optimala, medan exempelvis cylindrospermopsin oftare finns fritt i vattenmediet.

Laboratoriestudier av hepatotoxinproducerande arter har visat att cyanobakterierna producerar toxiner kontinuerligt och att halten av hepatotoxiner ökar successivt så att den är högst i sen logaritmisk tillväxtfas (Sivonen, 2009). Man har konstaterat att microcystiner syntetiseras och finns i cellen under alla tillväxtfaser. Ljus, pH, temperatur, järn-, zink-, kväve- och fosfortillgång har i laboratoriestudier visats inverka på halten microcystin per biomassa, biovolym eller per cell (Lukac & Aegerter, 1993; Vézic et al., 2002). Det finns en del studier som indikerar att toxinproduktionen ökar då cyanobakterierna utsätts för olika typer av stress. I flertalet studier har man dock konstaterat att den maximala toxinbildningen sker under inverkan av samma förhållanden som också gynnar optimal tillväxt. Det stöder hypotesen att miljöfaktorer påverkar cyanotoxinproduktionen indirekt genom att påverka energistatus och tillväxt hos cyanobakterierna (Bickel & Lyck, 2001).

När det gäller *Microcystis aeruginosa* har man visat att begränsad kvävetillgång fungerar som en avgörande faktor för tillväxt och produktion. Både *Microcystis* och *Planktothrix* producerar mer toxin i ett kväverikt medium (Sivonen, 2009). Kvävefixerande arter som *Anabaena*, *Aphanizomenon* och *Nodularia* är däremot inte beroende av ett kväverikt tillväxtmedium för att kunna producera toxiner. Sammanfattningsvis kan man slå fast att det finns många motsägelsefulla resultat när det gäller betydelsen av kväve och fosfor för microcystinproduktionen hos cyanobakterier. Hos *Microcystis*-arter verkar toxinsyntesen påverkas olika beroende på vilken art det rör sig om (Vézic et al., 2002) och den specifika artens eller stammens genetiska förutsättningar (Rohrlick et al., 2001; Kurmayer et al., 2002).

Cyanobakteriearter har olika ljusoptimum. *Planktothrix* föredrar låg ljusintensitet för bästa tillväxt och *Aphanizomenon* vill ha hög intensitet, medan *Anabaena* föredrar ett mellanting (Sivonen, 2009). De flesta cyanobakteriearter i tempererade zoner växer bäst i temperaturintervallet 18 till 25 °C, medan låga temperaturer (< 10 °C) liksom höga (> 30 °C) har reducerande effekt på toxinproduktionen. Temperaturen kan också påverka vilken typ av toxin som bildas (Rapala et al., 1997; Rapala & Sivonen, 1998). Höga temperaturer (> 25 °C) främjar produktionen av microcystin-RR, medan låga temperaturer gynnar microcystin-LR. En och samma cyanobakterieart kan också producera olika bioaktiva substanser under olika miljöbetingelser (Sivonen, 2009). Bickel och Lyck (2001) föreslår att eftersom microcystinsyntesen är energiberoende, borde variation i toxinproduktion huvudsakligen förklaras av bakteriecellens energistatus och att näringstillgång (P, N och Fe) samt ljusbetingelser endast har en indirekt påverkan, eftersom cellens energistatus ändrar under stress. Då cellen endast har en begränsad energitillgång kommer fokus i första hand att ligga på att upprätthålla den essentiella proteinsyntesen, medan toxinproduktionen får stå tillbaka. Det finns också studier som hävdar att genotypisk diversitet hos olika stammar är den avgörande faktorn för variabiliteten i toxinhalter hos algbloomingar som domineras av samma arter (Rohrlick et al., 2001; Kurmayer et al., 2002).

Fältstudier, där man undersöker cyanobakterierna i deras naturliga miljö, är förstås svårare att sätta upp än studier utförda på ett laboratorium. Här spelar nyckfulla faktorer som väderförhållanden en avgörande roll. Väderbetingelserna påverkar fytoplankton i mycket hög grad och styr sammansättningen och utvecklingen av algblomningar. Eftersom det finns så många aspekter som påverkar uppkomst, sammansättning och toxicitet hos algblomningar är fältstudier och systematisk övervakning mycket viktiga hjälpmedel för att öka kunskapen om cyanobakterier. I fältstudier har man visat att samma faktorer som befrämjar eutrofiering; så som höga kväve- och fosforhalter samt höga vattentemperaturer också gynnar toxinproduktion hos cyanobakterier (Sivonen, 2009). Det finns även en negativ korrelation mellan microcystinkoncentration och siktdjup. Det rör sig dock inte om något linjärt samband mellan t.ex. toxinkoncentrationer och näringstillgång, vilket framkommer av att grönalger ofta dominerar över cyanobakterier i hypereutrofa förhållanden.

De flesta cyanobakterieblomningar består av både toxiska och nontoxiska arter (Sivonen, 2009). Säsongsmissig variation av dominerande cyanobakteriearter förekommer i takt med årstidernas växlingar. På norra halvklotet har man dokumenterat cyanobakterieblomning under isen vintertid. I tempererade regioner är det ofta *Microcystis* som dominerar under sommaren för att sedan lämna över stafettspinnen till kvävefixerare som *Anabaena* och *Aphanizomenon* när hösten kommer. Toxinkoncentrationer i vatten i samband med algblomning varierar mycket beroende på mängd och sammansättning av cyanobakteriearter, men kan ibland komma upp i väldigt höga nivåer. Toxinkoncentrationer i milligramnivåer per torrsubstans cyanobakterier har uppmätts för alla toxintyper; microcystiner, nodularin, anatoxin-a(S) samt STX. Dylika höga toxinnivåer har ofta rapporterats i samband med förgiftningsfall hos djur.

Mot ovan givna bakgrund och det faktum att få eller inga fältstudier gjorts i östersjöområdet genomfördes den föreliggande studien. Huvudsyftet var att genom en hel betessäsong följa leverstatus hos nötkreatur på kustbeten med östersjövatten som huvudsakliga vattentillgång (2011).

## MATERIAL OCH METODER

### Studiedesign och analyser

Fyra besättningar med betesdrift längs delar av östersjökusten, där algblomningar ofta uppstår, valdes ut för att ingå i studien. Tre besättningar var lokaliserade på Åland och en på Hasselö utanför Loftahammar, Västerviks kommun, på den svenska östkusten. Betesmarkerna på Åland var belägna i Ängösund; Lumparlands kommun, Bergö; Finströms kommun samt Önningeby; Jomala kommun. I varje besättning valdes sex kor eller kvigor ut enligt kriterierna att djuren skulle gå tillsammans på ett kustbete under hela betessäsongen med havsvatten som huvudsaklig dricksvattenkälla. Blodprover samlades in från djuren vid tre tillfällen, period 1, 2, 3. Period 1 definieras från 15.5.2011 till 30.6.2011. Period 2 definieras från 1.7.2011 till 31.7.2011. Period 3 definieras som 1.8.2011 – 15.10.11.

Vattenprover samlades in kontinuerligt under dessa perioder av djur- eller markägarna. De flesta prover är tagna med ungefär en veckas mellanrum (Se Tabell 2-5)., men på Hasselö togs prover enbart i samband med de tre blodprovtagningstillfällena. Vattenproverna frystes in varefter de insamlades och analyserades sedan under hösten 2011. Vattenanalyserna utfördes vid institutionen för Anatomi, Fysiologi och Biokemi, SLU, Uppsala, med hjälp av en standard assay för fosfatashämmare; Microcystins/Nodularins PP2A Microtiter Plate, Test for the Detection of Microcystins and Nodularins in Water, producerad av Abraxis LLC under produktnummer 520032.

Testmetoden baserar sig på microcystinernas fosfatasinhiberande effekt. Under normala betingelser hydrolyserar fosfatasenzymet ett för testkittet specifikt substrat, vilket kan detekteras vid 405 nm. I vattenprover som innehåller microcystiner inhiberas emellertid enzymaktiviteten proportionellt mot mängden toxin i provet. Toxinkoncentrationen i provet beräknas med hjälp av en standardkurva. Alla substanser som fungerar som fosfatasinhibitorer fångas upp i denna assay och den lägre detektionsgränsen sattes till 0,25 µg/l. Samtliga fosfatasinhibitorer är toxiska. Man kan förvänta sig att större delen av de fosfatasinhibitorer som detekterats i vattenproverna utgörs av microcystiner och nodulariner eftersom dessa cyanotoxiner hör till de vanligast förekommande i Östersjön.

Insamling av blodprover skedde vid 3 tillfällen i samtliga 4 besättningar och totalt samlades alltså 72 enskilda prover från de 24 djur som ingick i studien. Venöst blod togs ur svansvenen med hjälp av vacutainer och serumrör. Det första provtagningstillfället ägde rum i slutet på maj (period 1) i samtliga besättningar. Den andra provtagningen skedde i mitten av juli (period 2) när algbloomingen beräknades nå sin kulmen. De sista proverna samlades in i slutet av september (period 3) och början på oktober, när algbloomingen förväntades vara överstånden.

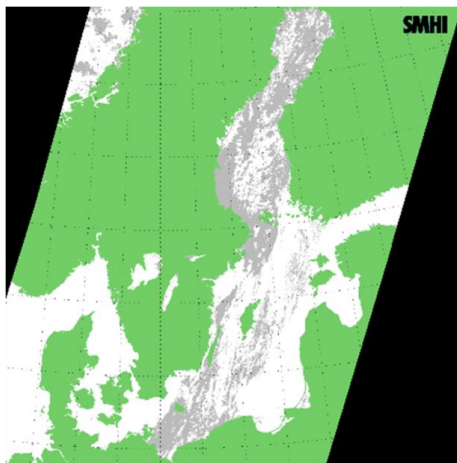
Blodproverna preparerades med hjälp av ett portabelt fältlaboratorium. Blodet tilläts koagulera i 30-60 minuter varefter det centrifugerades (5000 rpm) i 20 minuter och serum separerades innan det frystes in för att sedan analyseras senare under hösten då samtliga prover samlats in. Analyserna utfördes vid Klinisk Kemiska Laboratoriet vid Sveriges Lantbruksuniversitet. Följande 14 variabler analyserades; Alaninaminotransferas (ALAT), Aspartataminotransferas (ASAT), Alkaliskt fosfat (ALP), Gamma-glutamyltransferas (GGT), Glutamatdehydrogenas (GLDH), gallsyror, totalbilirubin, kolesterol, urea, krea, totalprotein, albumin, triglycerider och glukos. En del prover testades även med avseende på hemolys. Följande index användes för att klassificera hemolys; 0,5–2,0 angavs som mild hemolys, 2,0–4,0 räknades som medel och >4,0 som kraftig hemolys. Analysresultaten omkodades i klassificerings- och effektvariabler och därefter användes statistik- och grafikprogrammet Prism för att undersöka signifikans. Column stat, One-way ANOVA test, Kruskal-Wallis' test och Dunn's test användes för att bearbeta data. Signifikansnivån bestämdes till  $p < 0,05$ . Tendens till signifikant skillnad bestämdes till  $p < 0,10$ .

## RESULTAT

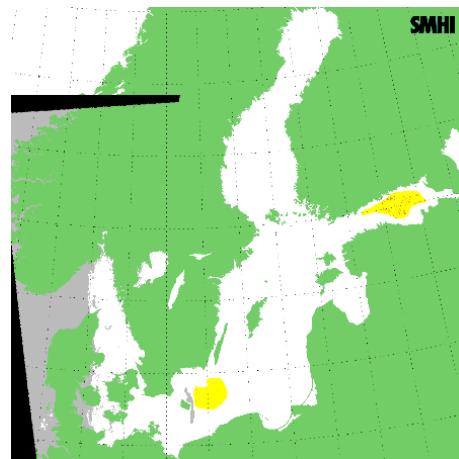
### Algblomningar under sommaren 2011

Under sommaren 2011 var cyanobakterieblomningarna längs Östersjöns kuster av ringa grad. Endast vid enstaka tillfällen kunde man för blotta ögat se spår av blomning i vattnet längs stränderna där de utvalda betesmarkerna, som ingick i studien, var belägna. Exempelvis rapporterades från Hasselö att man under några dagar i mitten på juli, ca en halv vecka innan provtagning nummer 2 genomfördes, kunnat se ansamlingar av blågröna alger i vattnet. På Åland sågs ingen blomning till längs stränderna på de aktuella betesmarkerna under hela försöksperioden. Däremot förekom periodvis en del blomningar längre ut till havs, vilket kan ses på bilder från SMHIs övervakning av algläget (Figur 3). De första tendenserna till cyanobakterieblomning sågs i slutet av juni i Finska viken och södra delen av Egentliga Östersjön. I slutet av augusti förekom ännu en del mindre ytvattenansamlingar i Bottenhavet. Sista övervakningsdagen var 8.9.2011.

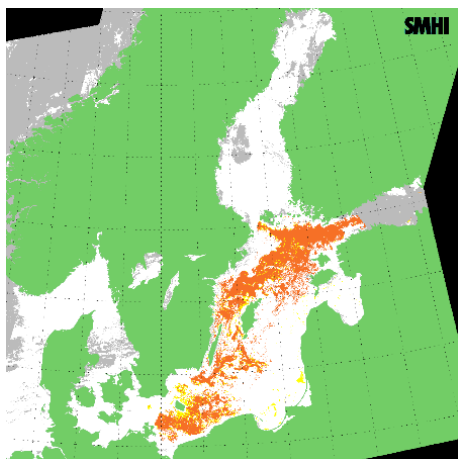
*Figur 3. A – P. Bildserie som beskriver algläget i Östersjön under sommaren 2011 (SMHI). Datum för dokumentation finns under varje bild tillsammans med i vilken period bilden infaller. Gult fält = risk för ytvattenansamling av alger. Orange fält = ytvattenansamling. Svart = inga data finns från detta område. Ljuslila fält = moln. P1 = period 1 (15.05.2011 – 30.06.2011). P2 = period 2 (01.07.2011 – 31.07.2011). P3 = period 3 (01.08.2011 – 15.10.2011).*



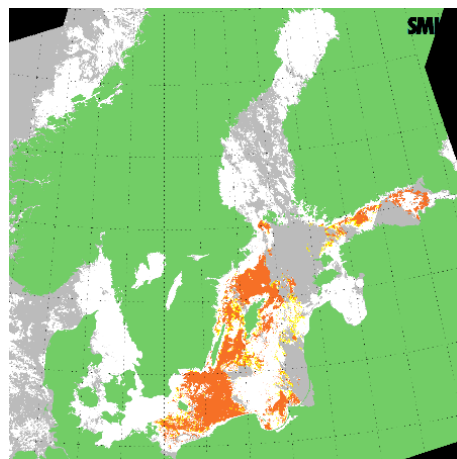
*Figur 3 A. 2011-06-01 kl 11.57. P1.*



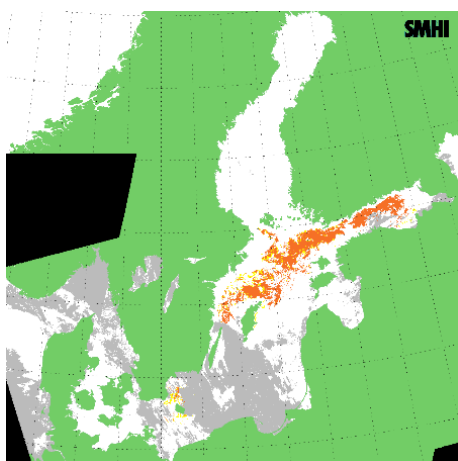
*Figur 3 B. 2011-06-29 kl 11.30. P1.*



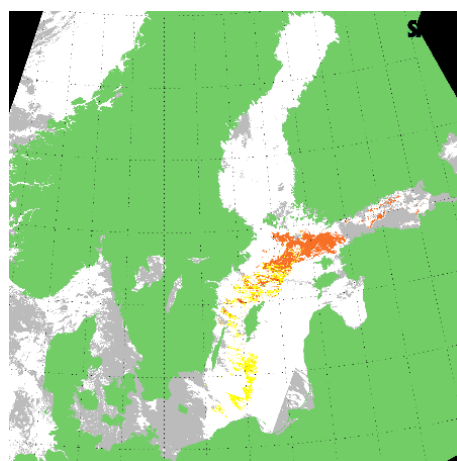
*Figur 3 C. 2011-07-07 kl 11.37. P2.*



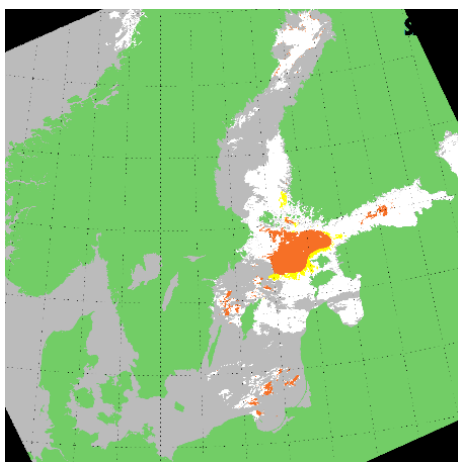
*Figur 3 D. 2011-07-09 kl 12.03. P2.*



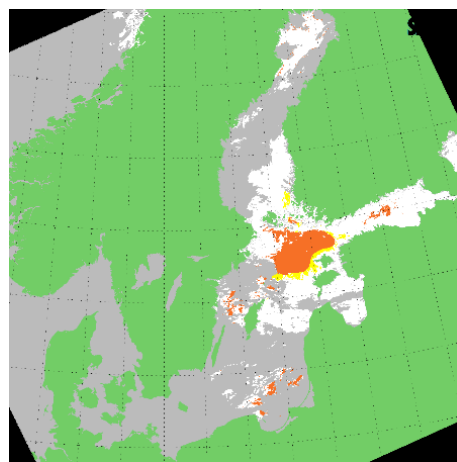
*Figur 3 E. 2011-07-12 kl 11.53. P2.*



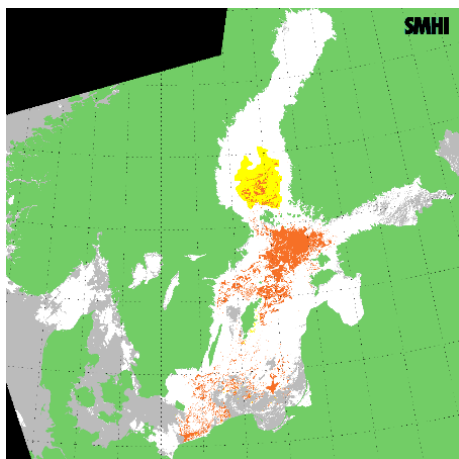
*Figur 3 F. 2011-07-17 kl 12.09 P2.*



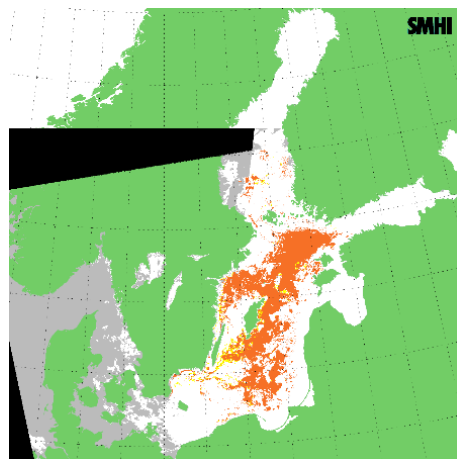
*Figur 3 G. 2011-07-19 kl 14.10. P2.*



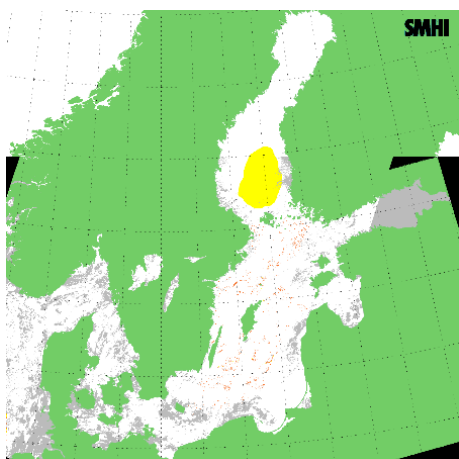
*Figur 3 H. 2011-07-22 kl 13.05. P2.*



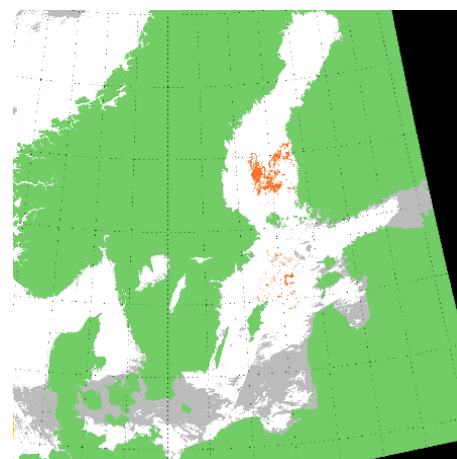
*Figur 3 I. 2011-08-01 kl 11.19. P3.*



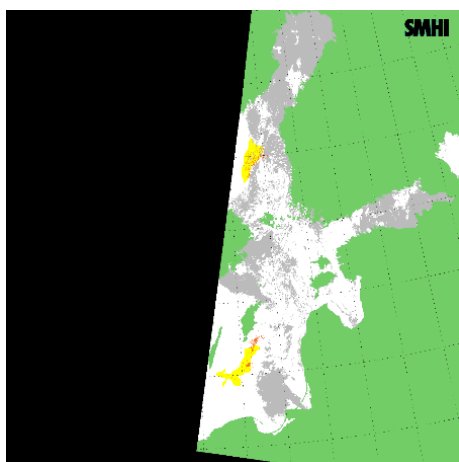
*Figur 3 J. 2011-08-04 kl 11.09. P3.*



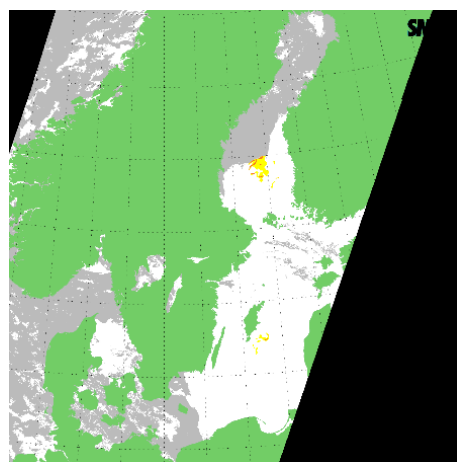
*Figur 3 K. 2011-08-08 kl 12.03. P3.*



*Figur 3 L. 2011-08-13 kl 12.19. P3.*

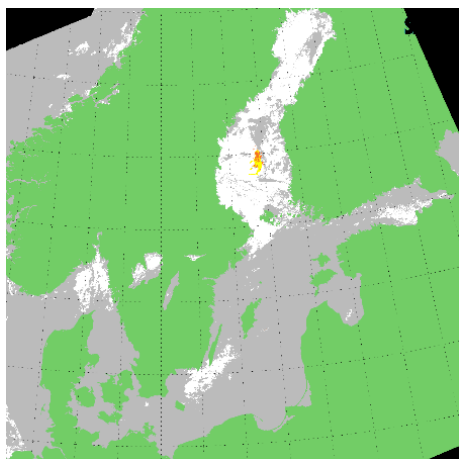


*Figur 3 M. 2011-08-23 kl 11.13. P3.*

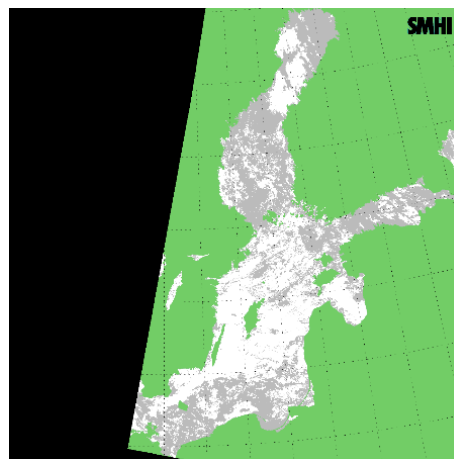


*Figur 3 N. 2011-08-27 kl 12.06. P3.*





Figur 3 O. 2011-08-30 kl 11.59. P3.



Figur 3 P. 2011-09-08 kl 11.26. P3.

### Vattenanalysresultat

Cyanotoxinhalterna är låga ( $<0,25 \mu\text{g/l}$ ) i de flesta prover, men det finns en del intressanta undantag från de genomgående låga värdena. I besättning 1 (Bergö) finns det i ett vattenprov från respektive period 1, 2 och 3, halter på  $0,40 \mu\text{g/l}$ . Även i besättning 3 (Önningby) uppmättes  $0,40 \mu\text{g/l}$ , men då enbart i period 3. De mest intressanta resultaten kommer emellertid från besättning 2 (Ängösund), där  $0,92 \mu\text{g/l}$  microcystin-LR detekterades i ett prov taget 18.8.2011 (period 3). Det ligger alltså mycket nära det gränsvärde på  $1 \mu\text{g/l}$  för dricksvatten avsett för humankonsumtion, som WHO har fastställt. För övrigt uppmättes i ett flertal prover från sistnämnda besättning halter på  $0,40 \mu\text{g/l}$  och  $0,60 \mu\text{g/l}$ .

Tabell 2 – 5. Analysresultat från vattenprover insamlade kontinuerligt under försöksperioden. Period 1 definieras från 15.5.2011 till 30.6.2011. Period 2 definieras från 1.7.2011 till 31.7.2011. Period 3 definieras som 1.8.2011 – 15.10.11.

Besättning 1 – Bergö, Finström								
Period 1	Temp <sup>°C</sup>	MCLR ( $\mu\text{g/l}$ )	Period 2	Temp <sup>°C</sup>	MCLR ( $\mu\text{g/l}$ )	Period 3	Temp <sup>°C</sup>	MCLR ( $\mu\text{g/l}$ )
28/5-11	14,0	$<0,25$	2/7-11	22,0	$<0,25$	6/8-11	19,0	$<0,25$
4/6-11	17,0	$<0,25$	10/7-11	23,0	$<0,25$	13/8-11	17,0	$<0,25$
11/6-11	24,0	$<0,25$	16/7-11	22,0	$<0,25$	20/8-11	17,0	$<0,25$
18/6-11	19,0	0,40	23/7-11	21,0	$<0,25$	3/9-11	15,0	0,40
24/6-11	18,0	$<0,25$	30/7-11	21,0	0,40	10/9-11	15,0	$<0,25$
-	-					17/9-11	13,0	$<0,25$

Tabell 2. Besättning 1. Bergö, Finström.



Besättning 2 – Ängösund, Lumparland								
Period 1	Temp°C	MCLR (µg/l)	Period 2	Temp°C	MCLR (µg/l)	Period 3	Temp°C	MCLR (µg/l)
4/6-11	14,0	0,40	5/7-11	20,0	0,60	10/8-11	20,0	0,60
8/6-11	17,0	0,40	15/-11	20,0	0,40	18/8-11	20,0	0,92
13/6-11	24,0	BDL	22/7-11	21,0	0,40	28/8-11	19,0	0,60
21/6-11	19,0	<0,25	29/7-11	21,0	BDL	10/9-11	17,0	0,40
27/6-11	18,0	0,60	-	-	-	25/9-11	13,0	0,45

Tabell 3. Besättning 2. Ängösund, Lumparland. BDL =below detection level.

Besättning 3 – Önningby, Jomala								
Period 1	Temp°C	MCLR (µg/l)	Period 2	Temp°C	MCLR (µg/l)	Period 3	Temp°C	MCLR (µg/l)
1/6-11	18,0	<0,25	6/7-11	20,0	<0,25	3/9-11	18,0° C	<0,25
8/6-11	24,0	<0,25	13/7-11	19,0	<0,25	10/9-11	17,0° C	<0,25
15/6-11	18,5	<0,25	25/7-11	20,1	<0,25	17/9-11	14,5° C	<0,25
22/6-11	17,8	<0,25	5/8-11	21,0	0,40	24/9-11	16,0° C	<0,25
29/6-11	27,0	<0,25	12/8-11	17,0	<0,25	30/9-11	18,5° C	0,40
-	-		17/8-11	21,0	<0,25	-	-	
-	-		26/8-11	18,0	<0,25	-	-	

Tabell 4. Besättning 3. Önningby, Jomala.

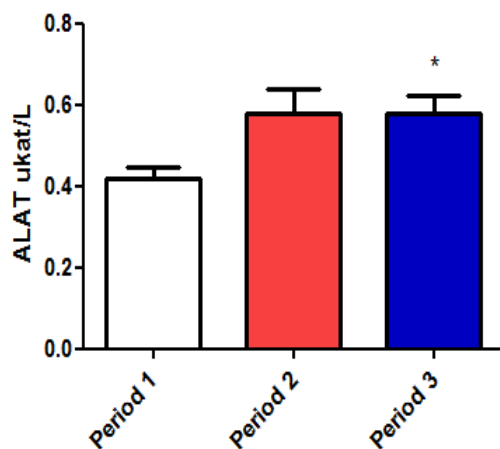
Besättning 4 – Hasselö, Västervik								
Period 1	Temp°C	MCLR (µg/l)	Period 2	Temp°C	MCLR (µg/l)	Period 3	Temp°C	MCLR (µg/l)
23/5-11	12,0	<0,25	16/7/11	22,0	<0,25	11/10-11	19,0	<0,25

Tabell 5. Besättning 4. Hasselö, Västervik

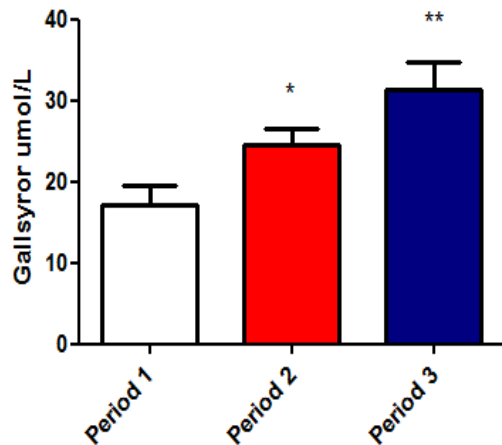
## Serumanalysresultat

Analysresultaten presenteras i grafer nedan i Figur 4 - 17. Referensvärden för de aktuella parametrarna är inte alltid lätta att hitta i litteraturen, eftersom denna typ av blodanalyser sällan görs på nötkreatur. Ofta får man sluta sig till ett ungefärligt normalspann baserat på olika källor. Se Tabell 6 för en sammanfattande redogörelse över referensvärden.

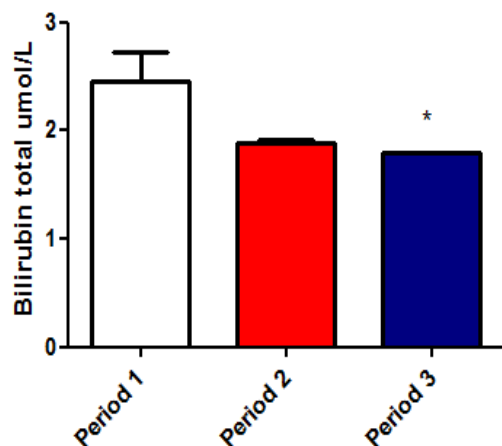
## Säsongspåverkade variabler



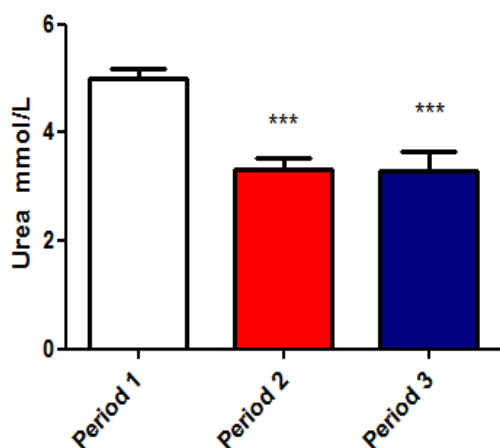
Figur 4. Koncentrationen av Alaninaminotransferas (ALAT) i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $*(p<0.05)$ ,  $**(p<0.01)$ ,  $***p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.



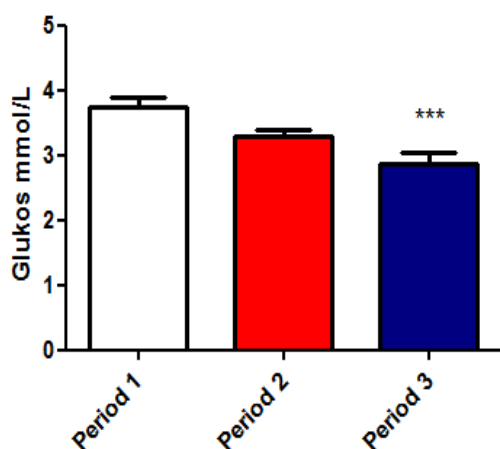
Figur 5. Koncentrationen av Gallsyror i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $*(p<0.05)$ ,  $**(p<0.01)$ ,  $***p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.



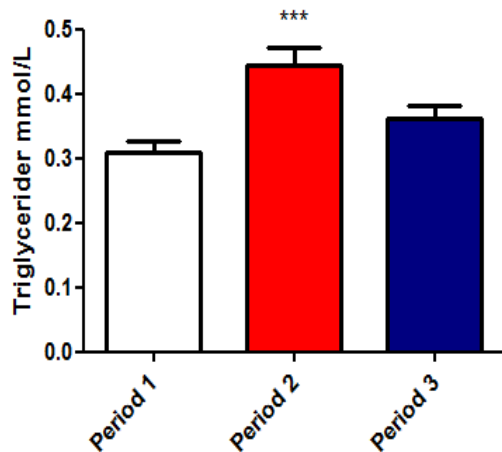
Figur 6. Koncentrationen av totalt Bilirubin i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $*(p<0.05)$ ,  $**(p<0.01)$ ,  $***p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.



Figur 7. Koncentrationen av Urea i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $^*(p<0.05)$ ,  $^{**}(p<0.01)$ ,  $^{***}p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.

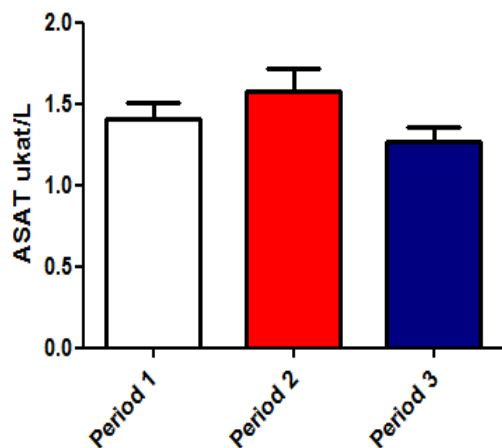


Figur 8. Koncentrationen av Glukos i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $^*(p<0.05)$ ,  $^{**}(p<0.01)$ ,  $^{***}p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.

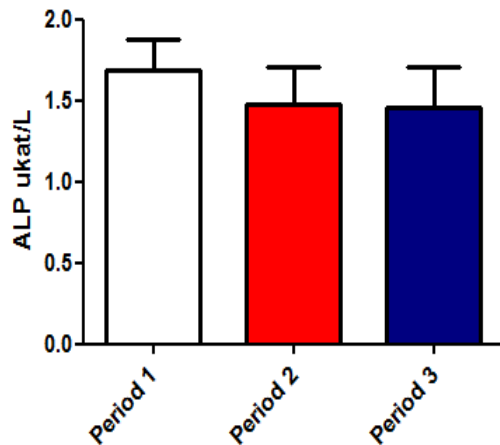


Figur 9. Koncentrationen av Triglycerider i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $^*(p<0.05)$ ,  $^{**}(p<0.01)$ ,  $^{***}p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.

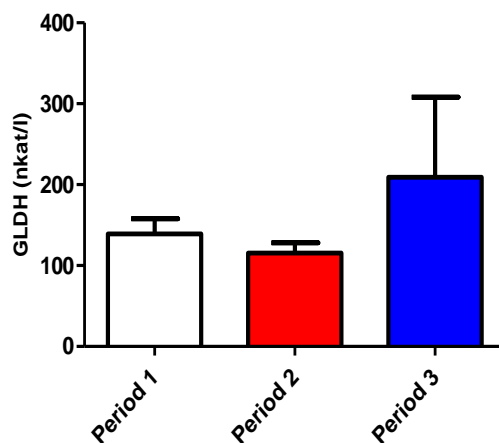
#### Säsongsopåverkade variabler



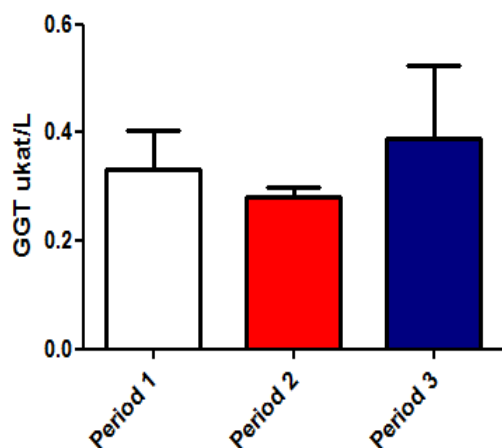
Figur 10. Koncentrationen av Aspartataminotransferas (ASAT) i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $^*(p<0.05)$ ,  $^{**}(p<0.01)$ ,  $^{***}p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.



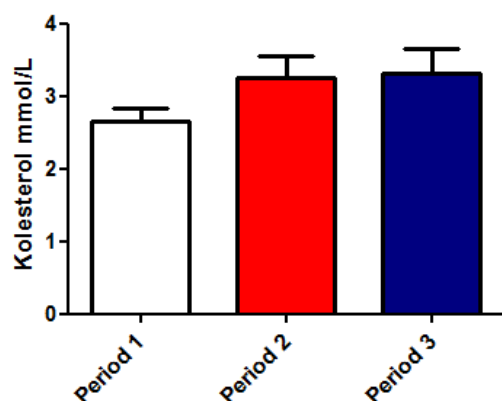
Figur 11. Koncentrationen av Alkaliskt fosfatas (ALP) i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $*(p<0.05)$ ,  $**(p<0.01)$ ,  $***p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.



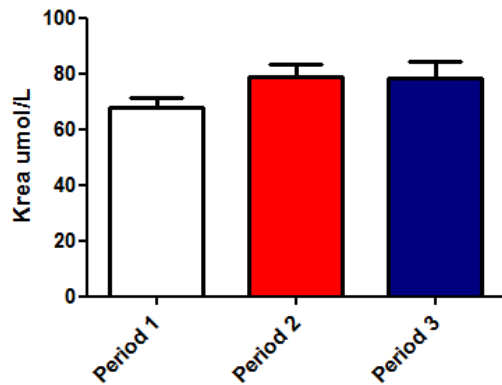
Figur 12. Koncentrationen av Glutamatdehydrogenas (GLDH) i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $*(p<0.05)$ ,  $**(p<0.01)$ ,  $***p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.



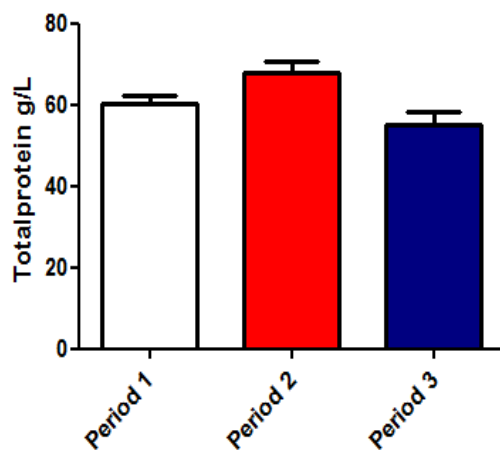
Figur 13. Koncentrationen av Gamma-glutamyltransferas (GGT) i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $*(p<0.05)$ ,  $**(p<0.01)$ ,  $***p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.



Figur 14. Koncentrationen av Kolesterol i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $*(p<0.05)$ ,  $**(p<0.01)$ ,  $***p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.

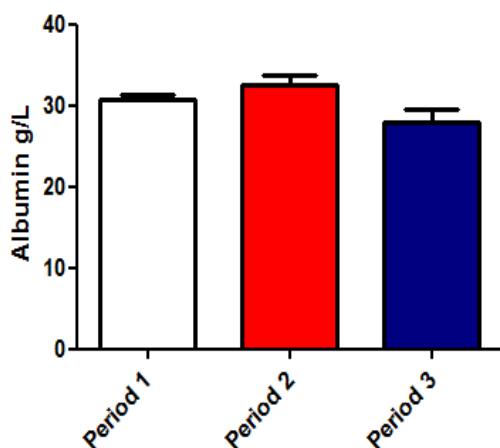


Figur 15. Koncentrationen av Kreatinin i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $^*(p<0.05)$ ,  $^{**}(p<0.01)$ ,  $^{***}p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.



Figur 16. Koncentrationen av Totalprotein i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $^*(p<0.05)$ ,  $^{**}(p<0.01)$ ,  $^{***}p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.





Figur 17. Koncentrationen av Albumin i blodserum hos kor på kustbete under våren (Period 1) sommaren (Period 2) och hösten (Period 3) 2011. Data utgörs av medelvärden ( $n=24$ ) med spridning (SEM). Eventuella signifikanta skillnader mellan Period 1 och Period 2 eller mellan Period 1 och Period 3 markeras med  $^*(p<0.05)$ ,  $^{**}(p<0.01)$ ,  $^{***}p<0.001$  För detaljerad information om tidsperioderna hänvisas till material och metoder.

Assay	Enhet	Lågt värde	Högt värde	Lågt värde	Högt värde
Källa ref.värde		K	K	SLU	SLU
ALAT	µkat/l		<0,7		
ASAT	µkat/l		<2,2		<2,3
ALP	µkat/l				
GLDH	µkat/l				<500
GGT	µkat/l		<0,3		<0,6
Gallsyror	µmol/l	20	80		
Kolesterol	mmol/l	1,5	2,3	1,3	4,4
Bil Tot	µmol/l	0,2	8,6		<5
Urea	mmol/l	7	11	3,6	8,2
Krea S	µmol/l	88	177	50	120
Glukos	mmol/l	2,5	4,2	2,4	4,4
Triglyc	mmol/l		<0,2		
T Prot	g/l	67	75	59	75
Albumin	g/l	30	36	32	38

Tabell 6. Sammanställning av referensvärden för de aktuella 14 blodserumparametrarna. Baserat på Kaneko (1997) samt referensvärderna från Klinisk kemiska laboratoriet, SLU (2012).

## DISKUSSION

Sommaren 2011 förekom kustnära cyanobakterieblomning i mycket ringa omfattning. Vid de strandbeten som ingick i studien sågs vid endast ett av betena och vid blott ett enda tillfälle tydlig algblooming i vattnet. Trots detta påvisades cyanotoxinhalter i ett flertal vattenprover och i ett prov, insamlat 18.8.2011 i Ängösund på Åland (besättning 2), tangeras till och med WHO's gränsvärde för dricksvatten. Vattenanalysresultaten är således intressanta ur den synpunkten att djur kan ha blivit exponerade för algtoxin även om koncentrationerna av dessa toxiner inte kommer i närheten de värden som uppmätts under en sommar med mer omfattande algblooming (Mazur-Marzec et al., 2008). Tyvärr fanns inte möjlighet att utföra analys av blodserum för påvisande av algtoxin inom ramen för detta arbete, vilket givetvis hade varit en stor styrka som komplement till vattenanalyserna. Dock kan den slutsatsen dras att det periodvis, och på vissa gårdar, fanns toxin i dricksvattnet men i vilken utsträckning djuren *de facto* blivit exponerade vet vi icke. I besättning 2 ses i period 3 i samband med att vattenprovet med de relativt höga toxinhalterna insamlades, ingen påverkan på serumvariabler förutom triglycerider, som ligger på medelvärdet 0,376667 (referensvärde <0,2). Detta indikerar att de förhöjda serumnivåerna av ALAT och gallsyror i mycket liten utsträckning har orsakats av cyanotoxiner eftersom dessa skillnader noterats under perioder då nivåerna av cyanotoxiner i de insamlade vattenproverna varit låga.

### Säsongspåverkade variabler

När det gäller serumanalyserna har en del beaktansvärda resultat framkommit. Ett av de mest intressanta resultaten rör den signifikanta ökningen av ALAT från period 1 till period 3. ALAT är ett enzym som hos djurslagen hund, katt och primater är av stort värde för diagnostik av leverskada, vid exempelvis levernekros, hepatos, hepatit och leverförfettning (Kaneko et al., 1997). Hos nötkreatur, liksom hos får, svin och häst, återfinns dock ALAT framför allt i skelettmuskulatur och en ALAT-ökning indikerar i första hand muskelskada. ALAT finns endast i låga koncentrationer i leverceller hos nöt och därmed är det endast vid mer grava och utbredda leverskador som en förhöjning av ALAT kan ses.

Enligt Kaneko's Clinical Biochemistry of Domestic Animals (1997) räknas ett ALAT-värde på 0,7  $\mu\text{kat/l}$  som ett högt värde för nötkreatur. ALAT-värdena för period 2 och 3 hamnar på ca 0,6, dvs. det ligger relativt högt och intressant är att det är en signifikant stegring av ALAT i period 3 jämfört med period 1. Detta skulle kunna indikera en ökad belastning på levern under sensommaren, vilket naturligtvis skulle kunna bero på många olika saker. Parasitangrepp av exempelvis lilla leverflundran (*Dicrocoelium dendriticum*) eller möjligen stora leverflundran (*Fasciola hepatica*) är t.ex. en relativt vanlig orsak till leverskador hos betande nötkreatur (SVA<sup>3</sup>, 2011). Det är även tänkbart att ALAT-ökningen orsakas av en förändring av fodersammansättningen då betesfloran växlar under sommaren och att det då skulle finnas vissa växter som ger upphov till en lindrig negativ påverkan på levern. Men faktum kvarstår att cyanotoxiner hittades i flera vattenprover och i enstaka fall dessutom i relativt höga koncentrationer.

Man kan alltså inte utesluta att de förhöjda ALAT-nivåerna åtminstone i viss mån skulle kunna vara ett uttryck för en subklinisk effekt av cyanotoxiner i dricksvattnet. Analyser av serum från algförgiftade kor verkar genomföras relativt sällan vid fall av akut förgiftning eftersom de flesta studier enbart tar upp makroskopiska och histologiska obduktionsfynd snarare än serumanalysresultat. Det finns dock en studie av Orr et al. (2003), där man under en period på 28 dagar exponerade köttjur för låga doser ( $1 \times 10^5$  celler per ml) av *Microcystis aeruginosa* och där man inte kunde se förändringar i serumparametrarna GGT, GLDH, ASAT och bilirubin. Dessvärre analyserades inte ALAT i nämnda studie. En direkt jämförelse mellan vår fältstudie och de resultat av serumanalyser som Orr et al. (2003) samt Frazier et al. (1998) presenterat i sina respektive studier är svår att göra eftersom doser av toxin och exponeringstid inte är direkt jämförbara.

Värdena för gallsyror stiger signifikant under period 2 och 3 jämfört med period 1. Gallsyror bildas i levern utgående från kolesterol (Kaneko et al., 1997). Vid olika former av hepatopati försämras leverns förmåga att ta upp de gallsyror, som absorberats från tarmen till portblodet, och det blir därmed ett ökat spill till den perifera cirkulationen. De flesta typer av leverskador ger upphov till förhöjda gallsyravärden och graden av funktionsstörning är avgörande för omfattningen av gallsyrastegringen. Hos nötkreatur och andra idisslare varierar gallsyranivåerna mycket och testet är därför tämligen svårtolkat (the Merck veterinary manual, 2012). Det är alltså svårt att säga vad som föranlett det faktum att medelvärdena stiger under period 2 och 3, men fodersammansättningen är förmodligen en viktig faktor. Kanske framkallar också det mer kontinuerliga födointaget på betet en intensifierad ämnesomsättning och därmed en större gallsyraomsättning och ett ökat spill till den perifera cirkulationen. Det är också tänkbart att en ökad belastning av gifter, däribland eventuellt låga - måttliga nivåer av cyanotoxiner, i viss utsträckning ligger bakom stegringen. Cyanotoxiner tar sig till levern på samma sätt som gallsalter dvs. genom att utnyttja det enterohepatiska kretsloppet. Efter att toxinerna intagits via vatten eller föda tas de snabbt upp av gallsyraproteiner och transporteras till levern (McDermott et al., 1998; Eriksson et al., 1990).

Signifikant sänkning av totalbilirubin i period 3 jämfört med period 1 påvisades i studien. Värdena ligger dock väl inom normalvärdesintervallet och sänkningen kan högst antagligen förklaras med naturliga variationer i omsättningen av heminnehållande proteiner. Totalbilirubin är den sammantagna serumhalten av konjugerat och okonjugerat bilirubin (Kaneko et al., 1997). När serumnivån når en viss gräns passerar både konjugerat och okonjugerat bilirubin ut i det extravaskulära rummet och man kan då kliniskt se att djuret har ikterus. Ikterus kan orsakas av bl.a. olika typer av leverskador, gallstas, hemolys, kraftiga blödningar etc. Nötkreatur uppvisar som regel endast små förhöjningar av bilirubin även vid svårare leverskador. Det är snarare främst i samband med hemolytiska sjukdomar som man ser en stegring av bilirubin hos nöt. I the Merck veterinary manual (2012) framhålls emellertid att bestämning av serumbilirubin kan vara ett användbart test vid utredning av leverdysfunktion hos nötkreatur, varför våra data skulle kunna tolkas som en indikation på en viss leverpåverkan.

Vad gäller urea detekterades en signifikant sänkning av nivån i blodet mellan period 1 och 2 samt 3. Halterna ligger dock inom normalvärdesgränserna. Ureasänkningen har sannolikt åstadkommit av förändringar i fodersammansättningen. Nötkreaturen konsumerar det nya färskas betesgräset tidigt på säsongen och återväxten hålls tillbaka av kontinuerligt betande och därmed kan man tänka sig att djuren senare under sommaren ökar sitt intag av örter och mer vedartade växter med lägre proteininnehåll. Dessutom får djuren ofta proteinrika tillskottsfoder under stallperioden, vilket sällan förekommer under betessäsongen, och detta kan förmodas ha inverkat på ureahalterna i period 1.

Analys av glukos är indikerat hos djur med misstänkt leverskada. Vid grava hepatopatier ses nämligen hypoglykemi. Ett signifikant fall i serumglukosnivåerna mellan period 1 och 3 upptäcktes, men glukoshalterna ligger inom gränserna för referensvärdena. Även om blodglukos hos idisslare endast marginellt påverkas av födointag är det tänkbart att väsentliga skillnader i betesflorans sammansättning skulle kunna vara en förklarande faktor vad gäller glukossänkningen. Betesgräset är till exempel mycket mer sockerrikt under försommaren. En annan förklaring till de lägre glukosnivåerna är att djuren förmodligen har en snabbare kolhydrat-metabolism i period 2 och 3 då de gått på bete en längre tid och är mer fysiskt aktiva än under stallperioden. Dessutom måste djuren röra sig över större områden för att tillgodogöra sig samma mängd föda senare under säsongen då markerna börjar bli avbetade och därmed gör de av med mer energi under födosöket.

För triglycerider påvisades en signifikant skillnad mellan period 1 och 2 i form av en påtaglig förhöjning av serumnivåerna. Medelvärdena för samtliga 3 perioder ligger mellan 1,5 och 2 gånger högre än referensvärdet. Triglyceridhalterna speglar individens nutritionella status. De förekommer i serum bundna i proteinhaltiga komplex, kallade lipoproteiner (Pilsom et al. 1986). Det finns olika typer av lipoproteiner, high-density lipoproteins (HDL), low-density lipoproteins (LDL), very low-density lipoproteins (VLDL) och chylomicroner. Triglycerider är ett mått på samtliga lipoproteiners innehåll av triglycerider. Mängden lipoproteiner i blodet är en funktion av individens näringsstatus. Inom humanmedicinen är mätning av fetthalt i blodet ett mycket viktigt medel för att bestämma individuell nutritionell status samt för diagnostisering av en rad olika sjukdomar. När det gäller idisslarmedicin görs analys av triglycerider mycket sällan. Hos idisslare är levern inte ett primärt organ för lipogenes, så som den är hos icke-idisslare. Gastrointestinalkanalen och levern bidrar endast med 8 % av kroppens totala lipogenes hos idisslare (Ingle et al., 1972).

Det är svårt att säga vad de höga serumnivåerna av triglycerider, som påvisades i studien, beror på. Triglycerider analyseras oerhört sällan på nötkreatur och det kan tänkas att de referensvärden vi har att utgå ifrån inte fungerar för växande ungdjur utan snarare är bättre anpassade för lakterande mjölkkor än för de kvigor, som utgjorde huvuddelen av djurunderlaget i studien. Inga tecken på sjukdom eller annat som skulle kunna förklara de höga värdena sågs hos försöksdjuren.

## Säsongsopåverkade variabler

För resterande mer eller mindre leverspecifika enzymer; ASAT, ALP och GLDH samt GGT påvisades inga signifikanta skillnader. GLDH är en essentiell analys vid utredning av hepatopatier hos idisslare eftersom de övriga leverenzymerna är relativt svårtolkade.

ASAT är ett enzym som främst finns i muskler och lever (Kaneko et al., 1997). Analys av ASAT används företrädesvis vid diagnostik av muskelskador, men en ASAT-ökning ses även i samband med hepatocytiskada. I en studie av akut cyanotokikos på nötkreatur i USA detekterade Frazier et al. (1998) förhöjda halter av serumvariablerna ASAT, bilirubin och kreatininfosfokinas. I denna studie fann man ASAT-värden på 429 IU/L (ref.värde 40 – 130). Det faktum att vi inte kunnat se några signifikanta skillnader i ASAT-nivåer eller kreatinin, skulle kunna tyda på att de förändringar vi har påvisat när det gäller andra serumvariabler, inte beror på cyanotoxinpåverkan utan främst har andra bakomliggande orsaker.

Inga signifikanta skillnader i GLDH mellan de 3 perioderna kunde detekteras i studien. Enzymet GLDH finns hos nästintill alla djurslag, koncentrerat framför allt till lever, men återfinns även i viss utsträckning i njurarna (Kaneko et al., 1997). Det är i likhet med ALAT ett enzym som läcker ut vid hepatocytiskada. GLDH anses vara uteslutande leverspecifikt hos nötkreatur och är därmed ett bra test vid akut hepatocytiskada, men är inte lika sensitivt vid kronisk leversjukdom. Eftersom ingen påverkan på GLDH sågs i den studie, som genomfördes av Orr et al (2003) och där man experimentellt utsatte djur för låga toxindoser, tyder detta på att GLDH inte ökar vid låg per oral exponering av algtoxin. Orsaken till detta är för närvarande okänd.

I ett flertal publicerade studier har man konstaterat att cyanotoxiner inte verkar anrikas i kött eller mjölk från nötkreatur som exponerats för lindriga eller måttliga nivåer av gifterna. Vad som händer när djur under stora delar av betessäsongen utsätts för höga nivåer av cyanotoxiner i dricksvattnet, är emellertid i mångt och mycket fortfarande okänt och behöver utredas. Det tycks dock som om toxin-koncentrationer i området upp till 1 µg/l i dricksvattnet inte utgör någon akut risk för ohälsa och leverskada hos betande nötkreatur.

## SAMMANFATTANDE SLUTSATSER

Avslutningsvis kan konkluderas att denna studie har visat på att djur som exponeras för låga doser av algtoxin i sitt dricksvatten, dvs. upp till 1 µg/l, uppvisar en svag, eller ingen, påverkan på vissa av de kliniska parametrar, som normalt förknippas med nedsatt leverstatus. Algtoxinhalter i nämnda koncentrationer torde därför inte utgöra något större hot mot djurens hälsa. Studien innehåller ett unikt referensmaterial för framtida studier under kraftig algbloomning.

I framtida studier vore det en stor fördel om blodproverna samtidigt kunde analyseras för innehåll av toxin och markörer för leverskada. Undersökningar som visar vad som händer och hur bioackumulering sker när livsmedelsproducerande djur utsätts för höga nivåer av cyanotoxiner är motiverade. Det finns också en del oklarheter kring cyanotoxinernas öde i våmvätska. Vidare bör man utreda vilka potentiellt toxiska metaboliter som bildas då cyanotoxiner metaboliseras i kroppen. Kort sagt; mer forskning inom detta spännande område efterlyses!

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Amorim, A., Vasconcelos, V., 1999. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*. 37 (8), 1181 – 1185.
- Beasley, V.R., Lovell, R.A., Holmes, K.R., Walcott, H.E., Schaeffer, D.J., Hoffman, W.E., Carmichael, W.W., 2000. Microcystin-LR decreases hepatic and renal perfusion, and causes circulatory shock, severe hypoglycemia, and terminal hyperkalemia in intravascular dosed swine. *J.Toxicol. Environ. Health*. 61 (4), 281 – 303.
- Bickel, H., Lyck, S., 2001. Importance of energy charge for microcystin production. In: Chours, I. (Ed.), *Cyanotoxins – Occurrence, Causes, Consequences*. Springer, Berlin, 133 – 141.
- Boe, R., Gjærsten, B.T., Vintermyr, O.K., Houge, G., Lanotte, M., Doskeland, S.O., 1991. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 195, 237 – 246.
- Briand, J.-F., Jacket, S., Bernard, C., Humbert, J.-F., 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.* 34, 361 – 377.
- Byth, S., 1980. Palm Island mystery disease. *Med. J. of Aust.* 2, 40–42.
- Cai, J., Yang, J., Jones, D.P., 1998. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochem. Biophys. Acta*. 1366, 139 – 149.
- Carmichael, W.W., 2001. Health effect of toxin-producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs". *Hum. Ecol. Risk Assess.* 7, 1393–1407.
- Codd, G.A., 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecol. Eng.* 16, 51 – 60.
- Codd, G.A., Edwards, C., Beattie, K.A., Lawton, L.A., Campbell, D.L., Bell, S.G., 1995. Toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In: Wiessner, W., Schnepf, E., Starr, R.C. (Eds.), *Algae, Environment and Human Affairs*. Biopress Ltd., Bristol, England, 1 – 17.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S., Beattie, K.A., 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystins by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*. 37 (8), 1181 – 1185.
- Codd, G.A., Steffensen, D.A., Burch, M.D., Baker, P.D., 1994. Toxic blooms of cyanobacteria in Lake Alexandrina, South Australia — Learning from history. *Aust. J. Mar. Freshwater. Res.* 45(5) 731 – 736.

- Dawson, R.M., 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon*. 36 (7), 953 – 962.
- Ding, W.X., Ong, Ch.N., 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 1 – 7.
- Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, Ch.N., 2002. Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 321 – 331.
- Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, Ch.N., 2001. Pivotal role of mitochondrial  $\text{Ca}^{(2+)}$  in microcystin-induced mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1155 – 1161.
- Dow, C.S., Sowboda, U.K., 2000. Cyanotoxins. In: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 613 – 632.
- Eriksson, J.E., Toivola, D., Meriluoto, J.A.O., Karak, D., Han, Y-G., Hartshorne, D., 1990. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Dec;173(3), 1347 – 1353.
- Feitz, A.J., Lukondeah, T., Moffitt, M.C., Burns, B.P., Naidoo, D., Vedova, J.D., Gooden, J.M., Neilan, B.A., 2002. Absence of detectable levels of the cyanobacterial toxin (microcystin-LR) carry-over into milk. *Toxicon*. 40, 1173 – 1180.
- de Figueiredo, D.A., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Gonçalves, F.J.M., Pereira, M.J., 2004. Microcystin-producing blooms – a serious global public health issue. *Ecol. Environ. Saf.* 59, 151 – 163.
- Fischer, W.J., Dietrich, D.R., 2000. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164 (1), 73 – 81.
- Fitzgerald, D.J., 2001. Cyanotoxins and human health – overview. In: Chorus, I. (Ed.), *Cyanotoxins – Occurrence, Causes, Consequences*. Springer, Berlin, 179 – 190.
- Francis, G., 1878. Poisonous Australian lake. *Nature*. 18, 11 – 22.
- Frazier, K., Colvin, B., Styer, E., Hullinger, G., Garcia R., 1998. Microcystin toxicosis in cattle due to overgrowth of blue-green algae. *Vet. Hum. Toxicol.* Feb; 40(1):23-4.
- Fujiki, H., Suganuma, M., 1993. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A: the okadic acid class of compounds. *Adv. Cancer. Res.* 61, 143 – 196.



- Gehringer, M.M., Govender, S., Shah, M., Downing, T.G., 2003. An investigation of the role of vitamin E in the protection of mice against microcystin toxicity. *Environ. Toxicol.* 18 (2), 142 – 148.
- Gorham, P.J., Carmichel, W.W., 1988. Hazards of freshwater blue-green algae (cyanobacteria). In: Lembi, C.A., Waarland, J.R., (Eds.), *Algae and Human Affairs*. Cambridge University Press, New York, USA, 403 – 431.
- Haider, S., Naithani, V., Viswanathan, P.N., Kakkar, P., 2003. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere*. 52, 1 – 21.
- Hansson, L-A., 2008. Kan Östersjön restaureras? – Utvärdering av erfarenheter från sjöar. Naturvårdsverket. Rapport 5860, ISBN 978-91-620-5860-9.pdf
- Hakkarainen, J., Pehrson, B. 1987. Vitamin E and polyunsaturated fatty acids in Swedish feedstuffs for cattle. *Acta. Agr. Scand.* 37:3, 341-346.
- Heinze, R., 1999. Toxicity of the cyanobacterial toxin microcystin-LR to rats after 28 days intake with drinking water. *Environ. Toxicol.* 14 (1), 57 – 60.
- Henning, M., Rohrlack, T., Kohl, J.-G., 2001. Responses of *Daphnia galeata* fed with *Microcystis* strains with and without microcystins. In: Chorus, I. (Ed.), *Cyanotoxins – Occurrence, Causes, Consequences*. Springer, Berlin, 266 – 280.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 338: 873–878.
- Jukola, E., Hakkarainen, J., Saloniemi, H., Sankari, S. 1996. Effect of selenium fertilization on selenium in feedstuffs and selenium, vitamin E and beta-carotene concentrations in blood of cattle. *J. Dairy Sci.* 79:5, 831-837.
- Kaebernick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 1 – 9.
- Kaneko, Harvey, Bruss. 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th ed. Academic press, San Diego, CA, USA. ISBN 0-12-396305-2.
- Karjalainen, M., Engström-Ost, J., Kropinen, S., Peltonen, H., Pääkkönen, J.P., Rönkkönen, S., Suikkanen, S., Viitasalo, M., 2007. Ecosystem consequences of cyanobacteria in the northern Baltic Sea. *Ambio*. 36, 195-202.
- Kearns, K.D., Hunter, M.D., 2001. Toxin-producing *Anabaena flosaquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microb. Ecol.* 42 (1), 80 – 86.
- Kerr, L.A., McCoy, C.P., Eaves, D., 1987. Blue-green toxicosis in five dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Oct 1;191(7):829-30.

- Kononen, K., Hällfors, S., Kokkonen, M., Kuosa, H., Laanemets, J., Pavelson, J., Autio, R., 1998. Development of a subsurface chlorophyll maximum at the entrance to the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1089-1106.
- Kurmayer, R., Jüttner, F., 1999. Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *J. Plankton. Res.* 21, 659 – 683.
- Kurmayer, R., Dittman, E., Fastner, J., Chorus, I., 2002. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis spp* in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb. Ecol.* 43, 107 – 118.
- Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bragham, C.A., Brenner, D.A., Herman, B., 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem. Biophys. Acta* 1366, 177 – 196.
- Lennartsson, T., Stighäll, K., 2005. Landmiljöer i kust och skärgård. Naturvårdsverket. Rapport 5482, ISBN 91-620-5482-1.
- Magalhães, V.F., Soares, R.M., Azevedo, S.M.F.O., 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon.* 39, 1077 – 1085.
- Majsterek, I., Sicinska, P., Tarczyska, M., Zalewski, M., Walter, Z., 2004. Toxicity of microcystin from cyanobacteria growing in a source of drinking water. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 139, 175 – 179.
- Manon, S., Priault, M., Camougrand, N., 2001. Mitochondrial AAA-type protease Ymel p is involved in Bax effects on cytochrome c oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 1314 – 1319.
- Mazur-Marzec, H., Spoof, L., Kobos, J., Pliński, M., Meriluoto, J., 2008. Cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularins, in fresh and brackish waters of Pomeranian Province, northern Poland. *Ocean. Hydrob. Stud.* 37 (4): 3-21.
- McDermott, C.M., Nho, C.W., Howard, W., Holton, B., 1998. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon.* 36, 1981 – 1996.
- McGavin, M.D., Zachary, J.F., 2007. Pathologic basis of veterinary disease. 4<sup>th</sup> edition. Mosby Elsevier.
- Mez, K., Beattie, K., Codd, G., Hanselmann, K., Hauser, B., Naegeli, H., Preisig, H., 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Eur. J. Phycol.* 32 (2), 111 – 117.

- Migita, K., Tanaka, F., Abiru, S., Ida, H., Izumi, Y., Kawakami, A., Eguchi, K., 2003. The role of mitochondria in nitric oxide-mediated thymocyte apoptosis. *Immunol. Lett.* 15 (90), 87 – 91.
- Milutinovi, A., Sedmark, B., Horvat-Znidarsic, I., Suput, D., 2003 el 2002??. Renal injuries induced by chronic intoxication with microcystins. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7 (1), 139 – 141.
- Mohamed, Z.A., Carmichael, W.W., Hussein, A.A., 2003. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ. Toxicol.* 18 (2), 137 – 141.
- Nagata, S., Soutome, H., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Sekijima, M., Sugamata, M., Harada, K., Suganuma, M., Ueno, Y., 1995. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. *Nat. Toxins.* 3 (2), 78 – 86.
- Naturvårdsverket, miljömålportalen. Hemsida. [online]. (2012-04-26). Tillgänglig: <http://www.miljomal.se/> [2012-04-26].
- Orr, P.T., Jones, G.J., Hunter, R.A., Berger, K., 2003. Exposure of beef cattle to sub-clinical doses of *Microcystis aeruginosa*: toxin bioaccumulation, physiological effects and human health risk assessment. *Toxicon.* 41 (5), 613 – 620.
- Orr, P.T., Jones, G.J., Hunter, R.A., Berger, K., De Paoli, D.A., Orr, C.L.A., 2001. Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk. *Toxicon* 39 (12), 1847 – 1854.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Paradies, G., 2003. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J.* 17, 2202 – 2208.
- Pilsum, V., Roon, J.F., Robert, J. 1986. *Biochemistry: Principles and Experiments.* University of Minnesota Press.
- Puschner, B., Galey, F.D., Johnson, B., Dickie, C.W., Vondy, M., Francis, T., Holstege, D.M., 1998. Blue-green algae toxicosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Dec 1;213(11):1605-7,1571.
- Pouria, S., de Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R.L., Barreto, V.T.S., Ward, C.J., Preiser, W., Poon, G.K., Neild, G.H., Codd, G.A., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet* 352, 21 – 26.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelä, S.I., 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins in *Anabaena* spp. As a function of growth stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (6), 2206 – 2212.

- Rapala, J., Sivonen, K., 1998. Assessment of environmental conditions that favour hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* spp. Strains cultured under light limitation at different temperatures. *Microb. Ecol.* 36, 181 – 192.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., 1999. *Biology of Plants*. W H Freeman and Company/Worth Publishers. New York.
- Rohrlack, T., Dittman, E., Börner, T., Christoffersen, K., 2001. Effects of cell-bound microcystins on survival and feeding of *Daphnia* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (8), 3523 – 3529.
- Runnegar, M.T., Kong, S., Berndt, N., 1993. Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. *Am. J. Physiol.* 265, G224 – G230.
- Rinehart, K.L., Harada, K., Namikoshi, M., Chen, C., Harvis, C.A., 1988. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 8557-8558.
- Sivonen, K. 2009. Cyanobacterial toxins. *Encyclopedia of Microbiology* (third edition), 290-307.
- Sjaastad O.V., Hove, K., Sand, O. 2010. *Physiology of Domestic Animals*. Second edition. Scandinavian Veterinary Press, Oslo, Norge.
- Statistiska centralbyråns databas [online], (2007). SCB, Stockholm. Tillgänglig: <http://www.ssd.scb.se/databaser/makro/visavar.asp?yp=duwird&xu=c5587001&lang=1&langdb=1&Fromwhere=S&omradekod=JO&huvudtabell=HusdjurK&innehall=Husdjur&prodid=JO0103&deltabell=&fromSok=&prekat=O> [2012-04-23]
- SVA<sup>1</sup> - Statens veterinärmedicinska anstalt. Hemsida. [online]. (2011-09-15). Tillgänglig: <http://sva.se/sv/Djurhalsa1/Foder/Forgiftning/Cyanobakterier/> [2012-04-26].
- SVA<sup>2</sup> - Statens veterinärmedicinska anstalt. Hemsida. [online]. (2011-09-15). Tillgänglig: [http://sva.se/sv/Djurhalsa1/Foder/Forgiftning/Blagrona\\_alger/](http://sva.se/sv/Djurhalsa1/Foder/Forgiftning/Blagrona_alger/) [2012-04-26].
- SVA<sup>3</sup> - Statens veterinärmedicinska anstalt. Hemsida. [online]. (2011-09-18). Tillgänglig: <http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Notkreatur/Endemiska-sjukdomar/Parasitsjukdomar/> [2012-06-03].
- Susin, S.A., Zamzami, N., Kroemer, G., 1998. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochem. Biophys. Acta* 1366, 151 – 165.
- The Merck Veterinary Manual. [online]. (2011). Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc. Whitehouse Station NJ, USA. Tillgänglig: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp> [2012-04-29].
- Toivola, D.M., Eriksson, J.E., 1999. Toxins affecting cell signaling and alteration of cytoskeletal structure. *Toxicol. In Vitro* 13, 521 – 530.

- Toivola, D.M., Eriksson, J.E., Brautigan, D.L., 1994. Identification of protein phosphatase 2A as the primary target for microcystin-LR in rat liver homogenates. *FEBS Lett.* 334, 175 – 180.
- Turrell, E.A., Lacaze, J.P., Stobo, L., 2007. Final report by CEFAS. 26.
- Turrell, E.A., Lacaze, J.P., Stobo, L., 2007. Harmful. *Algae.* 6, 438-448. Determination of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in UK shellfish.
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M.F., Park, H.D., Chen, G., Yu, S.Z., 1996. Detection of microcystin, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcogenesis.* 17 (6), 1317 – 1321.
- Vézie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitsonen, J., Sivonen, K., 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microb. Ecol.* 43 (4), 443 – 454.
- WHO, 2003. Algae and cyanobacteria in fresh water. In: Guidelines for safe recreational water environments. Vol. 1: Coastal and fresh waters. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, pp. 136 – 158.
- WHO, 1998. Cyanobacterial toxins: microcystin-LR. In: Guidelines for drinking water quality. 2<sup>nd</sup> Edition, Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, pp. 95 – 110.
- Williams, D.E., Dawe, S.C., Kent, M.L., Andersen, R.J., Craig, M., Holmes, C.F.B., 1997. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon.* 35 (11), 1617 – 1625.
- Zegura, B., Sedmark, B., Filipic, M., 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon.* 41 (1), 41 – 48.
- Zhou, L., Yu, H., Chen, K., 2002. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed. Environ. Sci.* 15 (2), 166 – 171.